

Хроматография



Практическое
приложение
метода

2

Хроматография

Практическое
приложение
метода

Journal of chromatography library — volume 22B

Chromatography

Fundamentals and applications of
chromatographic and electrophoretic methods

Part B: Applications

Edited by E. HEFTMANN

*Western Regional Research Center,
U. S. Department of Agriculture, Berkeley, CA 94710*

*Elsevier Scientific Publishing Company
Amsterdam — Oxford — New York*

Хроматография

Практическое приложение метода

Редактор Э. ХЕФТМАН

В 2-х частях

2

Перевод с английского
канд. хим. наук А. В. РОДИОНОВА

под редакцией
д-ра хим. наук, проф. В. Г. БЕРЕЗКИНА



Москва «Мир» 1986

ББК 24.5
Х94
УДК 543

Чармс Ш., Фишбейн Л., Вагман Дж., Вейнстейн М., Кау-
линг Г., Дольфин Д., Харборн Дж., Ледерер М., Янак Я.,
Адлард Э.

Хроматография: Практическое приложение метода:
Х94 В 2-х ч. Ч. 2. Пер. с англ./Под ред. Э. Хефтмана. — М.:
Мир, 1986. — 422 с., ил.

Монография, написанная ведущими хроматографистами ЧССР, Англии, Канады, США, Швейцарии и изданная под редакцией Э. Хефтмана (США), посвящена важнейшему современному аналитическому методу, который широко используется в научных исследованиях и в промышленности для контроля и управления технологическими процессами. В практическом аспекте рассматриваются все основные хроматографические методы: жидкостная, плоскостная, газовая, ионообменная хроматографии, гель-хроматография, электрофорез.

В ч. 2 объектами анализа являются углеводы, фармацевтические препараты, антибиотики, нуклеиновые кислоты, порфирины, фенольные соединения, пестициды, углеводороды, а также неорганические соединения и неуглеводородные газы.

Книга предназначена для специалистов в области химии, биохимии, медицины, фармацевтической промышленности, для служб по охране окружающей среды.

X 1804000000-432
041(01)-86 91-86, ч. 1

ББК 24.5

Редакция литературы по химии

© Elsevier Scientific Publishing Company, 1983

© перевод на русский язык, «Мир», 1986

Глава 7

Углеводы

Ширлей Чармс

7.1. Введение

Со времени появления в третьем издании обзора по хроматографии углеводов [1] в этом направлении произошли кардинальные изменения, обусловленные быстрым развитием ВЭЖХ. Множество классических методик, которым ранее придавалось большое значение в химии углеводов, в настоящее время вытеснены методами ВЭЖХ, и эта тенденция устойчиво сохраняется. Необходимо также отметить все более широкое применение аффинной хроматографии при выделении полисахаридов и гликопептидов, а также открытие в самое последнее время большого числа специфических лектинов. ГЖХ, особенно в сочетании с масс-спектрометрией, представляет собой один из наиболее важных методов структурного изучения углеводов. Продолжение широких исследований в этой области связано прежде всего с модернизацией способов получения летучих производных, повышением эффективности неподвижных фаз и улучшением других параметров, определяющих степень разрешения в такого рода анализах. Существенный прогресс в плоскостной хроматографии связан в последние годы с появлением пластинок для ВЭТСХ, обеспечивающих гораздо большую скорость и эффективность разделения, чем при использовании ТСХ. В настоящей главе в основном обсуждаются новейшие методики разделения и анализа углеводов и их производных и, кроме того, рассмотрены такие не утратившие до настоящего времени своего значения традиционные методы, как ионообменная и гель-хроматография, особенно с точки зрения их сравнения с различными современными автоматическими системами обнаружения, используемыми при хроматографическом анализе углеводов.

7.2. Колоночная хроматография

Термин «колоночная хроматография» применяется к различного рода системам, в которых механизм разделения связан с адсорбцией, распределением, ионным обменом или молекулярной эксклюзией в зависимости от природы неподвижной фазы.

Однако становится все более очевидным, что границы между этими типами разделения все больше стираются, так как часто хроматографический процесс нельзя описать в рамках лишь одного механизма разделения, особенно на некоторых сорбентах, используемых в настоящее время для ВЭЖХ. По этой причине хроматографические системы, рассматриваемые в данном разделе, сгруппированы скорее в соответствии с типом сорбента, нежели согласно механизму сорбции, за исключением тех случаев, когда последний очевиден.

7.2.1. Классические методы. Использование в препаративной хроматографии

Представлявшие ранее несомненную ценность методы адсорбционной хроматографии на колонках, заполненных смесью угля и целита [2], а также методы распределительной хроматографии на порошкообразной целлюлозе [3] в настоящее время утратили свое значение в качестве аналитических процедур, но сохранили определенную важность для препаративных целей. В качестве примера можно привести предварительное фракционирование на колонке (58×5 см), заполненной смесью угля и целита (в соотношении 2:3), олигосахаридов, образующихся при частичном гидролизе 50 г ксилана березы [4]. Ступенчатое элюирование водными растворами этанола с увеличивающейся концентрацией последнего дает в результате четырех хроматографических разделений (в каждом используется 25% гидролизата) обогащенные фракции, из которых далее при помощи других методов легко выделить олигосахариды вплоть до моносахарида (см. разд. 7.2.3).

Хроматографию на колонке с целлюлозой при температуре около 30°C при элюировании азеотропной смесью бутан-2-он — вода [5] можно применять для выделения индивидуальных метилированных моносахаридов из их смесей, образующихся при гидролизе метилированных полисахаридов [6]. Успешным также оказалось препаративное разделение метилированных сахаров на колонке с целлюлозой при ступенчатом элюировании смесями, содержащими петролейный эфир (т. кип. $100\text{—}120^\circ\text{C}$) и *n*-бутанол, насыщенный водой (в соотношении от 7:3 до 7:50; 9 ступеней), с последующим элюированием *n*-бутанолом, наполовину насыщенным водой [7].

Метод, недавно предложенный для получения макроколичеств β -глюкозы и ее α -(1 \rightarrow 4)-связанных олигомеров из кукурузной патоки, включает фракционирование соответствующих ацетильных производных на силикагеле в системе бензол — этилацетат (2:1) [8]. Таким способом из патоки (10 г), имеющей декстрозный эквивалент 43, были получены граммовые ко-

личества глюкозы, мальтозы и олигомеров до мальтопентозы включительно. Разделение хлороформного экстракта, полученного при ацетилировании исходного сиропа, было проведено за 14 ч на колонке (100×3 см) с силикагелем (70—230 меш) при скорости элюирования около 400 мл/ч. Для выделения свободных сахаров соответствующие фракции были подвергнуты деацетилированию под действием 0,1 М метоксида натрия с последующей деионизацией смешанными ионообменными смолами и упариванием полученных растворов до сиропообразного состояния. Было высказано предположение, что использование бензоильной защиты вместо ацетильной должно привести к улучшению результатов разделения из-за увеличения различия в молекулярных массах олигомеров.

7.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Из сорбентов, указанных в разд. 7.2.1, только силикагель обладает механической прочностью, обеспечивающей возможность проведения хроматографии при высоких давлениях, характерных для современной ВЭЖХ. Действительно, этот материал является в высшей степени подходящим носителем для ВЭЖХ по ряду причин [9], и в настоящее время подавляющее большинство подобного рода разделений проводится на колонках с тонкоизмельченным силикагелем или его производными подходящей полярности, полученными в результате химической модификации силикагеля. Хроматография углеводов не составляет исключения. Высокая полярность немодифицированного силикагеля препятствует его применению в хроматографии незамещенных сахаров, однако химическая обработка поверхности силикагеля позволяет получить производные, отвечающие всем требованиям ВЭЖХ свободных углеводов. Разработка сорбентов, в которых подходящая для распределительной хроматографии сахаров фаза присоединена к тонкоизмельченному силикагелю, устраняет необходимость получения производных, за исключением тех случаев, когда эта процедура имеет несомненные преимущества (см. разд. 7.2.2.1). Такого рода сорбенты в настоящее время широко используются при анализе углеводов.

Необходимо подчеркнуть, что ВЭЖХ углеводов находится все еще в стадии развития и что границы применения различных хроматографических систем окончательно не сложились. Одна из наиболее успешно используемых систем такого рода включает в качестве сорбента мелкодисперсную катионообменную смолу в кальциевой форме, несомненное преимущество которой заключается в возможности применения воды для элюирования углеводов. Эта система быстро завоевывает признание в качестве стандартной для анализа смесей ряда углеводов

[10]. Примеры использования каждого из трех указанных типов сорбентов для колонок рассматриваются ниже.

7.2.2.1. Тонкоизмельченный силикагель

С целью разработки быстрого метода разделения D-фруктозы, сахарозы, лактозы и сорбита, который мог бы найти применение в анализе пищевых продуктов, было изучено поведение при хроматографии на тонкоизмельченном силикагеле (размер частиц 5 мкм) обычно встречающихся сахаров и полиолов в водных системах, содержащих различные количества этилформиата и метанола [11]. Определенный успех в данном направлении был достигнут. Оказалось, что разделение такой смеси можно провести менее чем за 20 мин на стальной колонке ($150 \times 4,6$ мм), заполненной силикагелем (размер частиц 5 мкм), при элюировании смесью этилформиат — метанол — вода (6 : 2 : 1) со скоростью 0,9 мл/мин. Однако двумя группами исследователей было установлено [11, 12], что в случае близких построению сахаров данный метод анализа неприемлем.

Как указывалось выше, именно при хроматографии производных углеводов наиболее рациональным представляется использование колонок с немодифицированным силикагелем. МакДжиннис и Фанг [13] опубликовали данные о временах удерживания частично и полностью защищенных углеводов при хроматографии на стальной колонке ($250 \times 4,6$ мм) с силикагелем (10 мкм). Объектами исследования были гликозиды, частично метилированные сахара, изопропилиденные и бензилиденные производные, а также ряд полностью ацетилированных углеводов. Использование в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил — вода (9 : 1) при скорости элюирования 1,2 мл/мин позволило разделить смесь гексопиранозидов приблизительно за 20 мин, причем в некоторых случаях наблюдалось разрешение α - и β -аномеров. Например, время удерживания α - и β -метил-D-маннопиранозидов в данных условиях составляет 15,3 и 18,3 мин соответственно. Таким образом было показано, что этот метод можно использовать для анализа продуктов гликозидирования D-маннозы и отделения их от исходного моносахарида (время удерживания D-маннозы 22,4 мин). Для синтетической химии углеводов представляет интерес разделение 4,6-O-бензилиден- и 1,2-O-изопропилиден- α -D-глюкопиранозы в смеси ацетонитрил — вода (18 : 1), а также 1,2 : 5,6-ди-O-изопропилиден- α -D-глюкофуранозы и 2,3 : 5,6-ди-O-изопропилиден-D-маннофуранозы в системе n-гексан — этилацетат (1 : 3), каждое из которых в описанных условиях занимает 15 мин.

Из содержащихся в цитированной выше работе [13] данных о временах удерживания ряда полностью ацетилированных угле-

водов, включающего ацетаты целлобиозы, *D*-глюко- и *D*-галактопиранозы, а также метил- и фенил-*D*-глюкопиранозидов, следует, что ВЭЖХ на тонкоизмельченном силикагеле с использованием в качестве подвижной фазы смеси *n*-гексан — этилацетат (1 : 1) позволяет разделить α - и β -аномеры этих соединений. Это направление получило дальнейшее развитие в исследовании Тиема и сотр. [14, 15], которые в своей работе использовали колонку (250×3 мм) с силикагелем (5 мкм). В результате тщательного изучения влияния состава системы растворителей и скорости элюирования на эффективность разделения полностью ацетилованных 15 моносахаридов и 12 дисахаридов были найдены оптимальные условия анализа как ацетатов моносахаридов [система *n*-гексан — ацетон (10 : 1), скорость элюирования 0,46 мл/мин], так и ацетатов дисахаридов [система *n*-пентан — ацетон (7 : 2), скорость элюирования 0,39 мл/мин]. Продолжительность анализа всех 15 полностью ацетилованных моносахаридов составляла 2 ч, причем прекрасное разделение наблюдалось для ацетатов пар аномеров *D*-арабино-, *D*-глюко-, *D*-галакто и *D*-маннопираноз, а также для производных пар эпимеров *D*-глюко- и *D*-маннопиранозы и *D*-галакто- и *D*-талопиранозы, которые трудно разделить другими методами. Менее успешным оказалось разделение ацетатов дисахаридов, однако и в этом случае были получены некоторые ценные результаты (например, удалось разделить ацетилованные производные α - и β -целлобиозы и α - и β -маннобиозы).

Основное преимущество ВЭЖХ углеводов в виде их производных состоит в том, что введение подходящих хромофоров позволяет обнаруживать анализируемое соединение при помощи УФ-детектора, чувствительность которого существенно выше, чем дифференциального рефрактометра, обычно используемого в ВЭЖХ свободных сахаров (разд. 7.2.7). По этой причине, а также из-за легкости выделения в кристаллической форме и возможности исследования методами ЯМР- и масс-спектрометрии бензоаты и 4-нитробензоаты сахаров в последнее время интенсивно изучаются методом ВЭЖХ. О разделении смесей, содержащих полностью бензоилированные производные α - и β -аномеров *D*-маннозы, *D*-ксилозы, *D*-глюкозы и *D*-галактозы, а также бензоаты сахарозы, мальтозы, лактозы и мальтотриозы, сообщил Лерфелд [16]. Хроматография была проведена на колонке (2 м×2 мм) с силикагелем в линейном градиенте эфира в *n*-гексане (от 0 до 99% в течение 110 мин). Чувствительность УФ-детектора (254 нм) оказалась при этом достаточно высокой (содержание каждого сахара в пробе составляло 3—5 мкг). Полностью бензоилированные производные этиленгликоля и глицерина элюировались в приведенных выше условиях значительно раньше аналогичных производных моносахаридов

и имели различные времена удерживания. Таким образом, очевидно, что ВЭЖХ бензоатов представляет собой эффективный метод анализа сложных смесей сахаров и полиолов, встречающихся при деструктивном подходе к исследованию полисахаридов.

Успешному применению этого метода должно в значительной степени способствовать появление в самое последнее время всестороннего исследования Уайта и др. [17], которые опубликовали данные о временах удерживания полностью бензоилированных производных всех обычных нейтральных и аминсахаров, полиолов (ксилита, D-сорбита, дульцита и D-маннита), дисахаридов (мальтозы, лактозы и сахарозы) и некоторых метилгликозидов. Хроматографическая система, состоящая из колонки (300×3,9 мм) с силикагелем (10 мкм) и УФ-детектора (254 нм), обеспечила прекрасное разделение в системе *n*-гексан — этилацетат (5:1, скорость 1 мл/мин) пар аномеров полностью бензоилированных метилгликозидов. Для бензоатов свободных сахаров, однако, характерным оказалось появление при ВЭЖХ нескольких пиков, в некоторых случаях (например, D-фруктоза, L-рамноза) до пяти, что, с одной стороны, облегчает идентификацию, но, с другой, осложняет количественное определение сахаров в смеси. Поэтому Томпсон [18] предлагает перед бензоилированием проводить оксимирование, чтобы обеспечить образование единственного производного каждого сахара независимо от числа присутствующих в смеси изомеров, причем рекомендуется N-бензилоксимирование, позволяющее ввести в молекулу еще одну хромофорную группировку.

Введение хромофорной нитрогруппы в арильный остаток бензоилированного сахара сдвигает максимум поглощения с 230 до 260 нм, что в конечном итоге приводит к повышению чувствительности УФ-детектора, настроенного на поглощение при 254 нм. Нахтман и Будна [19] отметили существенное увеличение чувствительности детектора к 4-нитробензоилированным производным углеводов по сравнению с их бензоатами и изучили возможность применения данного метода для анализа смесей D-глюкозы, D-фруктозы, D-сорбита, сахарозы и лактозы, присутствующих в некоторых лекарственных препаратах. Авторам удалось с хорошим разрешением разделить 4-нитробензоаты α- и β-D-глюкозы, D-сорбита, сахарозы и α- и β-лактозы на колонке (150×3 мм) с силикагелем (5 мкм) в системе *n*-гексан — хлороформ — ацетонитрил — тетрагидрофуран (20:10:2:1). При скорости элюирования 1,46 мл/мин время анализа составило всего лишь 5 мин.

Применение спектрофотометрического детектора (260 нм) позволило анализировать нанограммовые количества производных углеводов. При хроматографировании образца, полученного

при 4-нитробензоилировании D-фруктозы, как и в случае бензоатов, были получены пики, соответствующие пяти изомерным 4-нитробензоилированным производным. Их разделение было проведено в течение 10 мин в системе *n*-гексан — хлороформ — ацетонитрил — вода (100 : 30 : 19 : 1) при скорости элюирования 1,4 мл/мин. Другим интересным примером, демонстрирующим возможности ВЭЖХ 4-нитробензоилированных производных, представляется проведенное Шварценбахом [20] разделение 4-нитробензоатов арабита, ксилита, маннита, сорбита и мальтита на колонке (250×3 мм) с силикагелем (5 мкм) в системе *n*-гексан — хлороформ — ацетонитрил (5 : 2 : 1, скорость 0,8 мл/мин). В этих условиях близкие по строению полиолы были полностью разделены за 20 мин.

Было показано также, что ВЭЖХ на тонкоизмельченном силикагеле играет важную роль в анализе гликолипидов, в особенности ганглиозидов мозга [21]. Бремер и др. [22] с успехом применяли предварительное полное бензоилирование при ВЭЖХ пикомольных количеств моносиалоганглиозидов на колонке (500×2,1 мм) с силикагелем (10 мкм) в линейном градиенте диоксана в *n*-гексане (от 7 до 23% в течение 18 мин) и фотометрическое детектирование при 230 нм.

Защищенные ненасыщенные дисахариды, образующиеся при ферментативном расщеплении хондроитинсульфатов А, В и С (т. е. хондроитин-4-сульфата, дермантансульфата и хондроитин-6-сульфата), также можно разделить ВЭЖХ на колонке с силикагелем (5 мкм). Полное разделение этих трех производных дисахаридов было проведено за 20 мин на колонке размером 250×4,6 мм в системе дихлорметан — метанол — 0,5 М формиат аммония (30 : 17 : 3, рН 4,8) при скорости элюирования 2 мл/мин [23]. Достаточно сильное поглощение перечисленных выше ненасыщенных дисахаридов обеспечивает надежную идентификацию ~100 нг каждого из них с помощью стандартного УФ-детектора (254 нм). Этот метод представляет потенциальный интерес для быстрого определения гликозаминогликанов в моче при диагностике заболеваний, обусловленных нарушением метаболизма мукополисахаридов, например при диагностике синдрома Хантера.

7.2.2.2. Привитые фазы

Введение в практику ВЭЖХ колонок, в которых подходящие полярные фазы (аминные, нитрильные или их сочетание) химически присоединены к тонкоизмельченному силикагелю, в значительной степени облегчило анализ незащищенных углеводов. Несмотря на то что некоторые авторы сообщают об успешном применении колонок с привитыми фазами, изготовленными в

их лабораториях [24, 25], обычно рекомендуют пользоваться доступными в настоящее время стандартными сорбентами, которые промышленным способом помещены в колонки из нержавеющей стали. Среди такого рода колонок наибольшее распространение получили колонки с μ -бондапаком фирмы Waters Assoc., предназначенные специально для анализа углеводов, однако хорошие результаты достигнуты также на колонках с партисилом-10 PAC (Whatman, Reeve Angel Division), микропаком NH_2 (Varian), а также в самое последнее время — хромосорбом LC-9 (Johns-Manville) и с лихросорбом- NH_2 (Merck) [26]. Во всех случаях в качестве сорбента используют силикагель со средним диаметром частиц 10 мкм, с которым химически связана полярная фаза.

В ВЭЖХ углеводов на колонках с привитыми фазами элюентом обычно служит водный ацетонитрил, причем относительное содержание обоих компонентов в системе зависит от природы разделяемых соединений. Линден и Лохид [27] подобрали оптимальные условия разделения и количественного определения фруктозы, глюкозы, сахарозы, мелибиозы, раффинозы и трех изомерных фруктозилсахароз (1, 6-кестозы и неокестозы), а также α -(1 \rightarrow 4)-связанных олигомеров D-глюкозы (мальтодекстринов), присутствующих в гидролизатах крахмала. Из полученных результатов следовало, что для разделения олигосахаридов наилучшей является подвижная фаза, содержащая 75% ацетонитрила, тогда как при хроматографии моносахаридов необходимо использовать системы с более высоким содержанием ацетонитрила. Глюкоза и фруктоза, времена удерживания которых при хроматографии в 75%-ном ацетонитриле совпадают, были успешно разделены в 90%-ном ацетонитриле. Однако повышение концентрации ацетонитрила привело к существенному увеличению времен удерживания и в результате — к уширению пиков, соответствующих этим углеводам, что обусловило выбор 85%-ной концентрации ацетонитрила в воде в качестве оптимальной для разделения. В большинстве сообщений по ВЭЖХ сахаров, опубликованных до настоящего времени, для фракционирования моносахаридов используют подвижную фазу, содержащую 80—88% ацетонитрила, а для разделения олигосахаридов — 65—75%-ный раствор ацетонитрила.

В этих условиях (и при скорости элюирования 1—2 мл/мин) обычные моносахариды можно разделить примерно за 20 мин, а олигосахариды со степенью полимеризации (СП) до 5 в течение 30—40 мин на стандартной колонке фирмы Waters с μ -бондапаком (300 \times 3,9 мм). Обзор примеров использования этой колонки для анализа углеводов при исследовании пищевых продуктов составлен Конрадом и Палмером [28]. Хроматографические данные для сахаров и полиолов представлены так-

Таблица 7.1. Коэффициенты емкости для ВЭЖХ сахаров и полиолов на колонках для анализа углеводов, заполненных μ -бондапаком (Waters)

Соединение	Коэффициент емкости		Литература
	85%-ный вод- ный ацетонит- рил	75%-ный вод- ный ацетонит- рил	
Глицерин	1,3	—	28—30
<i>мезо</i> -Эритрит	1,7	—	30
D-Арабит	2,8	—	28, 30
D-Сорбит	4,0	—	28, 30
Дульцит	4,3	—	28
D-Маннит	4,3	—	28, 30
<i>мио</i> -Инозит	11,2	—	28—30
D-Рибоза	1,7	—	12, 29
D-Ликсоза	2,1	—	12
D-Ксилоза	2,2	—	12, 29, 30
L-Арабиноза	2,8	—	12, 28, 29
D-Манноза	3,8	—	12, 28, 29
D-Глюкоза	4,2	0,9	12, 28—30
D-Галактоза	4,7	—	12, 28, 29
2-Дезокси-D-глюкоза	1,7	—	12
6-Дезокси-D-глюкоза	2,0	—	12
L-Рамноза	1,4	—	12, 29
L-Фукоза	1,9	—	12, 29
D-Фруктоза	3,3	—	12, 28—30
D- <i>манно</i> -Гептулоза	5,0	—	29
Сахароза	9,0	1,5	12, 28—30
Трегалоза	12,4	—	30
Мальтоза	11,9	2,1	12, 29
Изомальтоза	—	2,5	12
Лактоза	15,0	2,4	12, 29
Меллибиоза	19,3	2,7	12, 29
Раффиноза	28,2	3,4	12, 29

же в работах, содержащих сведения о применении данного метода для изучения компонентов мочи [29] и лишайников [30]. Некоторые значения коэффициентов емкости приведены в табл. 7.1.

Разделение олигосахаридов с более высокой молекулярной массой ($СП > 5$) в течение приемлемого времени не представляется возможным в стандартных условиях, описанных для ВЭЖХ углеводов; его, однако, можно провести с программированием скорости элюирования (65%-ный водный ацетонитрил со скоростью 2 мл/мин в течение 10 мин, далее скорость увеличивают до 4 мл/мин в течение 20 мин). Этот прием позволяет разделить мальтодекстрины с СП до 10 за 30 мин [28, 31]. Альтернативный подход заключается в изменении рН подвижной фазы до 5 прибавлением ацетатного буфера, что приводит к уменьшению ширины пиков и повышению эффективности разделения [32]. Разделение мальтодекстринов с СП до 10 на колонке

с партисилом-10 РАС (полимерная аминокцианофаза) было проведено примерно за 40 мин при элюировании 65%-ным раствором ацетонитрила в 0,0025 М натрий-ацетатном буфере (рН 5) со скоростью 1 мл/мин. Интересно также отметить высокую эффективность колонки с партисилом-10 РАС при разделениях β -(1 \rightarrow 4)-связанных олигомеров D-глюкозы (целлодекстринов) и соответствующих восстановленных олигосахаридов [33]. Изократическое элюирование смесью ацетонитрил — вода (71 : 29) со скоростью 1,5 мл/мин обеспечивает за 24 мин хорошее разделение смеси, содержащей как нормальные, так и восстановленные целлодекстрины с СП до 6.

Эффективность ВЭЖХ высших олигосахаридов на колонках с привитыми фазами повышается при проведении хроматографии в градиентных системах, однако в этом случае возможности дифференциального рефрактометра, обычно используемого при детектировании незащищенных сахаров, крайне ограничены. В последнее время эти трудности удалось преодолеть при помощи метода, который включает быстрое образование удобных для детектирования производных после разделения свободных сахаров на колонке [26, 34] (колориметрический метод с использованием тетразолиевого синего; см. разд. 7.2.7). Удовлетворительные результаты разделения гомологичных олигосахаридов (из гидролизатов крахмала, ксилана и инулина) с СП до 20 были получены при хроматографировании в течение 40 мин на колонке (250 \times 4,3 мм) с хромосорб- NH_2 в линейном градиенте ацетонитрила в воде (от 70 до 62,5% или от 66 до 57%) при скорости элюирования 1 мл/мин.

Среди новых примеров применения ВЭЖХ на колонках с привитыми фазами необходимо отметить полное разделение α -, β - и γ -циклодекстринов (циклоамилоз, содержащих 6, 7 и 8 α -(1 \rightarrow 4)-связанных остатков D-глюкозы соответственно) в течение 15 мин на колонке с μ -бондапаком фирмы Waters при 25 $^{\circ}\text{C}$ в 70%-ном водном ацетонитриле (скорость 2 мл/мин) [35], а также разделение 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы и ее β -(1 \rightarrow 4)-связанных олигомеров (образующихся при гидролизе хитина) вплоть до пентасахарида за то же время в аналогичных условиях [36]. Дисахариды, являющиеся продуктами ферментативного расщепления клинически важных хондроитинсульфатов А, В и С (обсуждались в разд. 7.2.2.1), также можно быстро разделить на колонке с привитой фазой [37]. На стандартной колонке с партисилом-10 РАС (250 \times 4,6 мм) полное разделение этих трех олигосахаридных фрагментов при элюировании смесью ацетонитрил — метанол — 0,5 М формиат аммония (рН 4,8, в соотношении 12 : 3 : 5) со скоростью 2 мл/мин занимает 10 мин, тогда как на колонке такого же размера при замене фазы на лихросорб- NH_2 и элюировании смесью метанол —

0,5 М формиат аммония (рН 4,8, в соотношении 7:13) с той же скоростью время анализа сокращается до 8 мин. Эти сорбенты позволяют добиться лучшего разделения и более высокой эффективности, чем тонкоизмельченный силикагель [23].

Простые разделения, которые можно выполнить методом распределительной хроматографии, проводят на колонках с немодифицированным тонкоизмельченным силикагелем, добавив к элюенту небольшое количество полифункционального амина (0,1% перед введением образца и 0,01% в процессе хроматографирования) [33, 39]. Образующееся на поверхности силикагеля модифицирующее покрытие обеспечивает удовлетворительное разделение D-фруктозы, D-глюкозы, сахарозы, мальтозы, лактозы и раффинозы. Этот метод представляет собой приемлемую замену дорогостоящих привитых фаз в лабораториях, занимающихся в основном анализом указанных выше сахаров. Главный недостаток привитых аминных фаз заключается в ухудшении характеристик разделения уже после 4 мес непрерывной работы [27, 29]. Эту трудность удастся обойти, используя колонки с силикагелем, модифицированным *in situ*, так как аминная фаза регенерируется после каждого цикла разделения.

Распределительная ВЭЖХ на колонках с обращенными привитыми фазами до последнего времени не получила широкого распространения в химии углеводов, однако два недавних сообщения, вероятно, стимулируют интерес к этому методу. Уэллс и Лестер [40] сообщили о прекрасном разделении полностью ацетилованных олигосахаридов на привитых октадецилуглеводородных фазах (видак или бондапак C₁₈/корасил). Разделение ряда полностью ацетилованных олигосахаридов мальтодекстринов с СП до 30 на двух последовательно соединенных колонках (1 м×3,2 мм) с этими сорбентами при 65 °С в градиенте водного ацетонитрила (от 10 до 70%) при скорости 2 мл/мин было проведено за 80 мин. Обращенные фазы на основе тонкоизмельченного силикагеля (5 мкм) можно также использовать для разделения полностью алкилированных олигосахаридов. Успешным оказалось применение этого метода для фракционирования сложных смесей частично метилированных и частично этилированных олигосахаридов, образующихся при структурном исследовании полисахаридов, на колонке (250×4,6 мм) с зорбаксом ODS (Du Pont) при элюировании 50%-ным водным ацетонитрилом со скоростью 0,5 мл/мин [41]. Выделение подобного рода защищенных олигосахаридов с последующим установлением характера распределения алкильных заместителей позволяет выяснять последовательность моносахаридных остатков в исходном полисахариде. Разработкой данного метода сделан существенный вклад в методологию анализа сложных полисахаридов.

7.2.2.3. Лигандный обмен на катионообменных смолах

В ряде сообщений [42—45] и в обзоре [46] подробно изложены результаты изучения возможности фракционирования простых смесей моносахаридов и небольших олигосахаридов на катионообменных смолах, обычно в Li^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - или Ba^{2+} -формах, при элюировании водой. В недавнем прошлом подобного рода анализы занимали много времени, но тем не менее не обеспечивали надежного разделения. Вследствие этого они представляли незначительный интерес, который, однако, существенно возрос вслед за введением в исследовательскую практику мелкодисперсных смол (с размером частиц 10—30 мкм), что позволило многократно повысить эффективность колонок. Поведение ряда сахаров и полиолов при хроматографии на смоле аминокс А-5 (Bio-Rad) в воде в зависимости от природы противоиона было изучено с целью оптимизации условий их быстрого разделения на данной смоле (размер частиц 11 ± 2 мкм) [47]. На основании результатов определения коэффициентов емкости был сделан вывод, что удовлетворительное разделение возможно при использовании в качестве противоионов Ag^+ , Ca^{2+} и La^{3+} , причем катиониты в Ca^{2+} -форме представляют наибольший практический интерес. В настоящее время хроматография на катионообменных тонкоизмельченных смолах в Ca^{2+} -форме в воде становится еще одним стандартным методом ВЭЖХ углеводов [10, 28].

Некоторые типичные результаты хроматографического разделения сахаров и полиолов с использованием данного метода представлены в табл. 7.2. Хроматографию обычно проводят при повышенной температуре (50—85 °С), чтобы исключить возможность искажения формы пиков, связанного с частичным разрешением аномеров некоторых сахаров. Время анализа существенно различается в зависимости от типа используемой смолы. Так, например, для разделения глицерина, D-сорбита и D-маннита — соединений, часто встречающихся в пищевых продуктах, а также для их отделения от D-глюкозы, D-фруктозы и сахарозы на колонке (600×7 мм), заполненной смолой аминокс Q 15-S (22 ± 3 мкм) в Ca^{2+} -форме, при 80 °С требуется около 25 мин при скорости подачи воды 1 мл/мин [28]. Этот метод, в частности, пригоден для фракционирования полиолов, которые лучше разделяются в данных условиях, чем на привитых фазах [28, 30], что, видимо, связано с существенными различиями в устойчивости комплексов противоион—полиол. Считается, что механизм, описывающий данный тип хроматографии, включает лигандный обмен: молекула полигидроксильного соединения обменивается на молекулы воды и удерживается в гидратной оболочке противоиона смолы за счет взаимодействий, сила

Таблица 7.2. Хроматографические данные для сахаров и полиолов, элюирующихся со смолы в Ca^{2+} -форме

Соединение	Время удерживания ^а			
	Смола:	Аминекс А-5	Аминекс Q15-S	Аминекс Q150-S
	Колонка:	500×2,8 мм	600×7 мм	610×8 мм
	Скорость:	0,1 мл/мин	1 мл/мин	0,6 мл/мин
	Температура:	Комнатная	80 °С	85 °С
	Литература:	[47]	[28]	[50]
				[30]
Глицерин		1,6	1,48	—
мезо-Эритрит		—	—	1,54
D-Рибит		—	—	1,49
D-Арабит		—	—	1,44
D-Сорбит		—	—	1,81
Дульцит		—	1,63	2,28
D-Маннит		2,4	—	—
мио-Инозит		1,9	1,35	1,79
D-Ксилоза		—	—	1,29
L-Арабиноза		1,1; 1,2 ^б	—	1,08
D-Манноза		—	1,19	—
D-Глюкоза		1,1; 1,3 ^б	1,12	1,16
		1,0 (15 мин); 1,2 ^б	1,00 (15 мин)	1,00 (28 мин)
D-Галактоза		1,2; 1,3 ^б	1,10	1,00 (9,5 мин) ^б
D-Гулоза		1,8	1,13	—
D-Талоza		3,8	—	—
D-Фруктоза		1,7 (асимм. пик)	1,18	1,32
Сахароза		0,9	0,86	0,88
Лактоза		—	0,89	—

^а Относительно D-глюкозы.^б Разрешившиеся аномеры.

которых зависит от способности гидроксильных групп образовывать координационные связи [47, 48].

Хроматография на мелкодисперсной смоле в Ca^{2+} -форме при элюировании водой находит также применение для быстрого разделения гомологичных олигосахаридов с СП до 6 или 7, т. е. содержащих до 6 или 7 углеводных остатков. Метод, рекомендуемый в качестве стандартного для анализа сбраживаемых сахаров (D-глюкозы, мальтозы и мальтотриозы) в пивном сусле [10], позволяет разделить смесь D-глюкозы и мальтодекстринов с СП до 6 за 20 мин [49]. Отличительной особенностью этого метода является использование колонки (300×7 мм), заполненной смолкой аминекс 50W-X4 (20—30 мкм) в Ca^{2+} -форме при температуре 80 °С (применяется электрический нагревательный блок); углеводы элюируют водой со скоростью 0,6 мл/мин. На более длинной колонке (610×8 мм) при температуре 85 °С,

поддерживаемой при помощи термостатируемой водяной рубашки, но в остальном в сходных условиях удалось за 36 мин разделить целлодекстрины с СП до 7 и отделить их от D-глюкозы [50].

Олигосахариды каждой гомологичной серии элюировались с колонки в порядке уменьшения размера их молекул. Было отмечено [49] также существование линейной зависимости между объемами элюирования (или временами удерживания) для каждого олигосахариды и логарифмами их молекулярных масс, откуда следует, что характер разделения олигосахаридов в данном случае определяется в основном механизмом молекулярной эксклюзии. Так как для больших молекул подход к противоиону смолы из пространственных соображений затруднен, хелатирование, которым обусловлено поведение моносахаридов и полиолов в данной хроматографической системе, в случае олигосахаридов, по всей видимости, не играет заметной роли.

Недавно было описано разделение α -, β - и γ -циклодекстринов на смоле аминекс 50W-X4 в Ca^{2+} -форме в воде при 90 °C [51], причем время удерживания каждого циклодекстрина было значительно больше, чем соответствующего линейного аналога. Это наводит на мысль, что специфическое взаимодействие с образованием соединений включения между циклодекстринами и сульфированной полистирольной матрицей может быть существенным фактором, дополняющим влияние различий в размере молекул олигосахаридов и циклодекстринов на характер их разделения.

Присутствие посторонних примесей в образцах, разделяемых на колонках с мелкодисперсной ионообменной смолой, приводит к ухудшению характеристик разделения (средний срок непрерывной службы колонки для анализа кукурузной патоки оценен в 2 мес [49]). Особенно нежелательны неорганические соли и кислоты, так как последние могут, например, катализировать гидролиз сахарозы до D-глюкозы и D-фруктозы. По этой причине Фитт [52] настоятельно рекомендует перед аналитической колонкой устанавливать предколонку (100×3 мм), в которой элюент сначала проходит через катионообменную смолу (20—35 мкм) в H^+ -форме, а затем через слой анионообменной смолы в OH^- -форме такого же объема и с таким же размером частиц. Этот прием позволяет увеличить срок службы колонки без существенных потерь в разрешении.

7.2.3. Распределительная хроматография на ионообменных смолах

Распределительная хроматография сахаров и полиолов на ионообменных смолах в водно-спиртовом растворе в качестве элюента интенсивно исследовалась Самуэльсоном с сотр. [53—

57]. Несколько прекрасных обзоров, посвященных этому методу и его применению для разделения углеводов, опубликовано в конце 60-х — начале 70-х годов [46, 58, 59]. В распределительной хроматографии существенную роль играют несколько факторов. Наиболее важным представляется характер распределения полярных молекул углеводов между подвижной фазой и смолой, где содержание воды больше, однако взаимодействия этих молекул с противоионами смолы и собственно матрицей также в значительной степени влияют на результат разделения. Все это обуславливает сложность механизма хроматографии и как следствие в некоторой степени непредсказуемость значений времен удерживания для различных сахаров. Как правило, значения коэффициентов распределения увеличиваются с ростом числа гидроксильных групп в сахарах, однако в некоторых случаях наблюдаются исключения: при хроматографии на анионообменной смоле в сульфатной форме D-талоza элюируется в 88%-ном этаноле раньше D-ксилозы [57]. При замене противоиона смолы нередко также происходит обращение порядка элюирования [56]. Значения коэффициентов распределения увеличиваются с ростом концентрации этанола и уменьшаются с повышением температуры, однако изменение перечисленных параметров обычно не сказывается на порядке элюирования сахаров с одной и той же смолы.

Всесторонние исследования, проведенные Самуэльсоном с сотрудниками, позволяют считать установленным, что наилучшие результаты разделения достигаются на анионообменной смоле в сульфатной форме или катионообменной смоле в литиевой форме при температурах от 75 до 90 °C и при концентрации этанола в элюенте от 86 до 90% в случае разделения смесей моносахаридов или от 65 до 80% — в случае олигосахаридов. Использование мелкодисперсных смол (8—15 мкм) дает прекрасные результаты при разделении многокомпонентных смесей сахаров, причем время анализа на колонках длиной 1 м и внутреннего диаметра 2—6 мм при скорости элюирования 8—20 мл/мин не превышает 3 ч. Для препаративной хроматографии на колонках большего диаметра (12—25 мм) при более низких скоростях элюирования (1—5 мл/мин) можно использовать смолы с большим размером частиц. В большинстве случаев смолы представляют собой сильноосновные анионообменники или сильнокислотные катионообменники со сшитыми полистирольными матрицами. Однако необходимо отметить, что разделения, которые невозможно осуществить на анионообменниках данного типа, например анализ смесей, содержащих D-фруктозу и D-тагатозу, можно провести на ионообменниках на основе сшитых декстранов, содержащих четвертичные аммониевые группировки [60]. Существенным является также тот факт, что

зачастую некоторые пары сахаров, с трудом поддающиеся фракционированию на одном ионообменнике, можно легко разделить с помощью другого.

Распределительная хроматография применима для анализа сахаров различных классов, а также полиолов [55] и производных сахаров, таких, как гликозиды и простые эфиры [61]. Сообщается [62], в частности, о разделении D-глюкуроновой и D-галактуроновой кислот и об отделении их от нейтральных моносахаридов на колонке с катионообменной смолой в Li^+ -форме при элюировании 89%-ным водным этанолом, причем в данных условиях времена удерживания уоновых кислот существенно меньше, чем присутствующих в смеси 2-дезоксид-рибозы и D-эритрозы. Описаны также результаты прекрасного разделения гомологичных олигосахаридов с СП до 8 или 9; например, хроматография ряда β -(1 \rightarrow 4)-связанных D-ксилоз с СП от 1 до 9 была проведена на колонке (910 \times 4 мм) с катионообменной смолой в Li^+ -форме в 80%-ном этаноле при температуре 75 $^{\circ}\text{C}$ [4]. Различные серии олигомеров D-глюкозы (мальто-, целло-, ламинари- и изомальтодекстрины) можно разделить на катионо- или анионообменных смолах, причем оптимальная концентрация этанола в элюенте варьирует в зависимости от природы гликозидной связи в исследуемых олигосахаридах [63]. В отличие от хроматографии на катионообменных смолах в воде (разд. 7.2.2.3) при разделении в водно-спиртовом растворе олигосахариды элюируются в порядке увеличения длины цепи при условии, что концентрация спирта превышает некоторое критическое значение, составляющее для смолы в сульфатной форме обычно 50—60%, а для смолы в Li^+ -форме 60—70%.

Хроматография углеводов на ионообменных смолах в водно-спиртовых растворах легко поддается автоматизации, и поэтому подобного рода системы одними из первых были использованы в сочетании с автоанализатором фирмы Technicon (разд. 7.2.7). Для анализа сахаров на этих колонках Ларрсон и Самуэльсон широко применяли автоматизированный орцин-серноокислотный метод [54, 59], тогда как детектирование полиолов с помощью автоанализатора было основано на использовании периодат-ацетилацетонового реагента [55]. Впоследствии орциновый вариант метода детектирования применяли в сочетании с периодатным для анализа сложных смесей сахаров и полиолов, а также восстанавливающих олигосахаридов [64]. В хроматографических системах обсуждаемого типа нашли применение автоматические колориметрические методы с использованием некоррозийных реагентов, таких, как тетразолиевый синий [62, 65] и медь-бихинхонинатный реагент [66, 67], так как присутствие этанола в элюенте не препятствует образованию соответствующих хро-

могенов. Сообщается также [68, 69], что при хроматографировании сахаров с помощью данного метода используются проточные детекторы.

7.2.4. Ионообменная хроматография

В химии углеводов наиболее широкое применение нашли два типа ионообменной хроматографии. Один из них, включающий разделение сахаров на анионообменных смолах в боратной форме, получил признание в качестве стандартной аналитической методики, усовершенствованию которой посвящено множество сообщений последних лет. Другой вариант ионообменной хроматографии предназначен в основном для фракционирования заряженных олигосахаридов и полисахаридов и предполагает использование в качестве матрицы декстрана или целлюлозы. Ниже рассматриваются области применения обоих ионообменников, причем особое внимание уделяется обсуждению последних достижений в данном направлении. Исчерпывающий обзор работ по ионообменной хроматографии, опубликованных за период с 1962 по 1970 год, составлен Яндерой и Шурачеком [46].

7.2.4.1. Ионный обмен на смолах

Устойчивость комплексов, образуемых борат-ионами с сахарами и полиолами, зависит от различных структурных факторов, которые обусловлены числом соседних *цис*-гидроксильных групп, а также от экспериментальных условий, в частности от pH и ионной силы среды и концентрации в ней борат-ионов. Первые сообщения о разработке метода разделения смесей сахаров на сильноосновной анионообменной смоле дауэкс 1 в боратной форме в ступенчатом градиенте pH (от 8 до 9) и концентрации боратного буфера появились около 30 лет назад [70, 71]. В дальнейшем этот метод нашел применение для фракционирования полиолов [72]. Однако предложенные первоначальные условия не обеспечивали удовлетворительного разделения, а время анализа составляло примерно 60 ч. Данный метод обычно не находил применения в качестве аналитической методики до тех пор, пока интенсивные исследования влияния различных факторов, в частности температуры, ионной силы буфера и размера частиц смолы, на эффективность и скорость хроматографии не привели к значительному улучшению характеристик разделения. Использование смолы со средним размером частиц 20 мкм и подогрева колонки до температуры $\sim 50^\circ\text{C}$ при градиентном элюировании буферами с увеличивающейся концентрацией бората ($0,1 \rightarrow 0,2$ М) и хлорида ($0 \rightarrow 0,2$ М),

а также повышение рН буфера от 8,0 до 9,5 позволили снизить время анализа многокомпонентной смеси сахаров до 8 ч и, кроме того, автоматизировать детектирование с помощью углеводного анализатора фирмы Technicon [74].

Продолжая поиски оптимальных условий для ионообменной хроматографии сахаров в форме боратных комплексов Флориди [75] предложил вернуться к ступенчатому элюированию. Рекомендуемая им система содержала только два буфера и обеспечивала разделение смеси, содержащей двенадцать сахаров (включая сахарозу, мальтозу, лактозу, мелицитозу и раффинозу, а также обычные моносахариды), за 6 ч. Разделение проводили на колонке (1,1 м×6 мм) со смолой дауэкс 1-X4 (200—400 меш) при температуре 55 °С. Колонку промывали в течение 90 мин буфером с рН 8,40 (0,025 М тетраборат калия — 0,125 М борная кислота, рН устанавливали путем добавления 1 н. КОН) со скоростью 45 мл/ч, а затем буфером с рН 8,80 (0,11 М тетраборат калия — 0,125 М борная кислота) со скоростью 60 мл/ч.

Другой важной модификацией данного метода явилось использование буферных систем с рН, поддерживаемым на уровне 7,0, что позволило избежать эпимеризации некоторых сахаров в щелочной среде при хроматографии, особенно при повышенных температурах. Для увеличения содержания борат-ионов при низких значениях рН в боратные буферы рекомендуется [76, 77] добавлять бутандиол-2,3. Смесь, содержащая 19 сахаров, была разделена примерно за 12 ч на колонке (1 м×4 мм) со смолой аминекс А-14 (20 мкм). Колонку элюировали последовательно двумя буферами с рН 7 (оба содержали борную кислоту и диол) со скоростью 20 мл/ч, повышая температуру колонки с 40 до 60 °С при переходе ко второму буферу. Однако, как было показано [78] впоследствии, присутствие в элюенте диола в некоторой степени мешает проведению колориметрических реакций, используемых при детектировании сахаров, входящих с колонки. Хорошее качество разделения смеси, содержащей трегалозу и все нейтральные моносахариды, обычно встречающиеся в полисахаридах и гликопротеинах, было достигнуто менее чем за 7 ч на колонке (750×6 мм) со смолой тайп-S (20 мкм, Technicon, температура 53 °С) при градиентном элюировании системой буферов с 0,1—0,4 М концентрацией бората и 0—0,2 М концентрацией хлорида. В процессе хроматографии рН буферов поддерживали около 7; скорость элюирования составляла 37 мл/ч. Последующие изменения температуры колонки (повышение до 62 °С) и скорости подачи буферов (увеличение до 60 мл/ч) обеспечили возможность проведения анализа большого числа сахаров и сокращения времени разделения до 6 ч и менее [79].

Использование новых мелкодисперсных смол привело к дальнейшему сокращению времени анализа. Применение колонки (190×6 мм, температура 60°C) со смолой дуррум DA-X4F (11 ± 1 мкм) при элюировании 0,4 М боратным буфером (рН 9,2) со скоростью 1,3 мл/мин позволило менее чем за 1 ч разделить смесь, содержащую сахарозу, D-рибозу, D-маннозу, L-арабинозу, D-галактозу, D-ксилозу и D-глюкозу [80]. Хорошие результаты были получены [81] при разделении 15-компонентной смеси, содержащей моно- и дисахариды, на колонке (300×4 мм) со смолой DA-X4 (20 мкм) в боратной форме, которую перед набивкой в колонку промывали 70%-ным водно-спиртовым раствором. Такая предварительная обработка приводит к некоторому сжатию смолы, которая после заполнения колонки и промывания водным буфером расширяется, плотно заполняя рабочее пространство колонки. Для анализа данной смеси в 0,5 М боратном буфере (рН 8,63) при температуре 78°C и скорости элюирования 24 мл/мин требовалось 2,5 ч.

Многообещающие результаты были получены при использовании макропористого ионообменника DEAE-сферона (гликоль-метакрилатная матрица) при анионообменной хроматографии сахаров в форме боратных комплексов. Разделение смеси трегалозы и шести обычных моносахаридов было проведено примерно за 2 ч при изократическом элюировании 0,15 М боратным буфером с рН 8,5 на колонке размером 500×6 мм при температуре 50°C [82], тогда как для хроматографирования смеси 12 сахаров, включающей 4 олигосахарида, на аналогичной колонке при ступенчатом элюировании тремя буферами с концентрацией бората 0,03—0,25 М и рН 7,50—8,88 при температуре 60°C потребовалось 4 ч [83] (в обоих случаях скорость элюирования поддерживали на уровне 50 мл/ч).

Ионообменную хроматографию на колонках со смолами в боратной форме применяли для разделения и анализа не только сахаров, но и полиолов [84, 85]. Для этой цели использовали такую же хроматографическую систему [85], как и в случае разделения сахаров [78], но хроматографию проводили при более высокой температуре колонки (75°C) и при большей скорости подачи буферов (70 мл/ч). Это обеспечивало разделение смеси, содержащей этиленгликоль, пять полиолов и два аминоксептополиола, за 4 ч [78]. С помощью анионообменной хроматографии в боратных буферах был успешно разделен ряд производных углеводов, в том числе несколько метилгликозидов [80], а также метиловые эфиры D-ксилозы, D-глюкозы и D-маннозы [86]; некоторые из них фракционировали на смоле аминекс А-14 (20 мкм) в буфере 0,11 М тетраборат калия — 0,17 М борная кислота (рН 8,8, температура 55°C , время анализа примерно 2,5 ч, колонка размером 990×2 мм).

Удовлетворительное разделение наблюдалось также для олигосахаридов с СП до 7, причем члены гомологических серий элюировались в порядке уменьшения длины цепи. В качестве примера подобного рода разделения может служить фракционирование олигомеров β -(1 \rightarrow 4)-связанной глюкозы от целлопептозы до целлобиозы, которое было проведено за 5 ч при градиентном элюировании (концентрация бората 0,05 \rightarrow 0,15 М, рН 7,0 \rightarrow 9,0) при температуре 53 °С на автоанализаторе фирмы Technicon [73]. Другие авторы предпочитают в сходных ситуациях ступенчатое элюирование на жидкостном хроматографе Jeol JLC-3BC [87, 88]. Использование трех буферов (борат 0,13—0,35 М, рН 7,5—9,6) при температуре 65 °С позволило за 5 ч разделить ряд α -(1 \rightarrow 6)-связанных изомальтодекстринов с СП от 1 до 7. Аналогичные условия хроматографирования описаны для некоторых других ди- и трисахаридов, содержащих остатки D-глюкозы (включая разветвленные трисахариды [88]), и их восстановленных производных. Было показано, что данный метод полезен для анализа продуктов ацетоллиза декстранов [87] и их ферментативного гидролиза [88]. Другим наглядным примером, демонстрирующим важность использования ионообменной хроматографии при установлении последовательности моносахаридов в полисахаридной цепи деструктивными методами, служит исследование Кочеткова и сотр. [89—91], которые успешно применяли хроматографию на смоле DA-X4 (изократическое элюирование 0,5 М боратным буфером, рН 8,5) при температуре 55 °С для разделения сложной смеси восстановленных олигосахаридов, полученных в результате обработки группового вещества крови Н боргидридом натрия.

В работах [92, 93] описано фракционирование уроновых кислот и отделение их от нейтральных сахаров с помощью ионообменной хроматографии в боратных системах, однако этот метод обладает серьезным недостатком: для вымывания кислых сахаров необходим буфер с очень высокой концентрацией бората (0,8—1,0 М), что нежелательно, поэтому в таких случаях предпочитают колонки со смолой в ацетатной форме, применяя элюенты, содержащие ацетат-ионы [94]. Моппер [95] разработал эффективный метод разделения уроновых и альдобиюроновых кислот на мелкодисперсной (11 мкм) смоле DA-X8F в ацетатной форме. Фракционирование смеси, содержащей D-галактуроновую кислоту, D-глюкуроновую кислоту и ее 4-O-метильное производное, D-маннуоновую кислоту, D-гулуоновую кислоту, L-идуоновую кислоту и четыре альдобиюроновых кислоты, было проведено примерно за 2,5 ч на колонке размером 380 \times 4 мм при 65 °С в 0,08 М ацетате натрия с рН 8,5 при скорости элюирования 30 мл/ч.

Для хроматографирования аминодезоксисахаров обычно ис-

пользуют катионообменные смолы, так как эти моносахариды лучше всего разделять в форме соответствующих хлоргидратов [96]. Для этой цели можно применять аминокислотный анализатор с цитратной буферной системой и нингидриновым методом детектирования. Так, например, хорошее разрешение 2-амино-2-дезоксид- D -глюкозы, 2-амино-2-дезоксид- D -маннозы и 2-амино-2-дезоксид- D -галактозы, а также соответствующих полиолов было получено примерно за 6,5 ч на анализаторе с колонкой (40×1 см), заполненной катионообменной смолой в Na^+ -форме, при 50°C , при элюировании со скоростью 45 мл/ч буфером 0,1 М по Na^+ , содержащим цитрат и борат (рН 7,5) [97]. Ступенчатое элюирование двухбуферной системой (0,1 и 0,2 М по Na^+) в тех же самых условиях позволяет проводить разделение восстановленных и N-дезацетилированных производных ряда ди- и трисахаридов, содержащих остатки аминосахаров, примерно за 10 ч. Этот метод играет важную роль в структурном исследовании гликопротеинов.

Ионообменную хроматографию углеводов можно успешно сочетать с большинством колориметрических методов детектирования, поддающихся автоматизации (разд. 7.2.7). Описано несколько полностью автоматизированных систем для анализа углеводов [74, 87, 98—101].

7.2.4.2. Хроматография на декстрановых и целлюлозных ионообменниках

Ионообменники на основе сшитых декстрановых матриц (сефадекс) более пористые, чем сшитые полистирольные смолы, в высшей степени отвечают требованиям хроматографии заряженных олигосахаридов и полисахаридов. При хроматографировании углеводов чаще всего используются слабоосновные анионообменники, содержащие диэтиламиноэтильные (DEAE) группировки. Доступны две разновидности такого ионообменника: DEAE-сефадекс А-25 и А-50 (Pharmacia Fine Chemicals), которые различаются пористостью структуры. Первый из них лучше использовать для фракционирования смесей кислых олигосахаридов, а также для отделения кислых компонентов от нейтральных, что часто необходимо при изучении гидролизатов кислых полисахаридов. Например, Аспиналл и сотр. [102—104] выделили продукты частичного кислотного гидролиза некоторых растительных камедей с помощью хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 в формиатной форме. Нейтральные сахара, присутствующие в гидролизате, элюировали водой, а кислые компоненты, удерживаемые при этом на ионообменнике, фракционировали затем в ступенчатом градиенте (0,05—0,5 М) муравьиной кислоты.

На DEAE-сефадексе А-50 можно фракционировать заряженные полисахариды: например, агары, различающиеся содержанием пируватных и сульфатных групп, были разделены на этом ионообменнике в хлоридной форме при ступенчатом элюировании водой и растворами с возрастающей (от 0,5 до 3 М) концентрацией хлорида натрия [105]. Олигогалактуриновые кислоты (СП 2—9), образующиеся при ферментативном гидролизе пектовой кислоты, были выделены в относительно больших количествах хроматографированием гидролизата на том же самом ионообменнике (элюирование водой с рН 6,0 и далее 0,05—0,275 М растворами хлорида натрия в 9 ступеней) [106].

Хроматографирование соединения с молекулами больших размеров лучше проводить на высокопористой целлюлозе, модифицированной различными заряженными группами. Из таких ионообменников наибольшее распространение для фракционирования кислых полисахаридов получила DEAE-целлюлоза [107]. Типичным примером ее применения может служить фракционирование полидисперсных полисахаридов растительных камедей на этом ионообменнике в фосфатной форме с использованием фосфатных буферов (от 0,1 до 0,5 М) [103, 104]. Рекомендуется также разделение на DEAE-целлюлозе в карбонатной форме в градиенте концентрации (0—0,5 М) карбоната аммония [108].

Появление микрогранулированных DEAE-целлюлоз привело к существенному увеличению разрешающей способности этого ионообменника. Мелкодисперсная DEAE-целлюлоза отличается практически полным отсутствием сорбции полисахаридов гликозаминогликанового типа, для фракционирования которых прежде необходимо было использовать целлюлозу, модифицированную слабоосновными эпихлоргидрин-триэтаноламинными группировками (ЕСТЕОЛА-целлюлоза) [109, 110]. Описано разделение гиалуриновой кислоты, гепаринсульфата, хондроитин-4-сульфата и гепарина на колонке с сефадексом G-50, присоединенной к колонке, наполненной микрогранулированной DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman) с использованием для колонки с сефадексом 0,15 М раствора хлорида натрия, а для колонки с DE-52 в хлоридной форме — раствора хлорида лития (0,2—1,2 М, рН 4,0) [111]. Дальнейшее развитие метод фракционирования кислых углеводов на DE-52 получил в исследовании Смита [112], который препаративно разделил смесь сиалилолигосахаридов женского молока на колонке со смолой, предварительно уравновешенной 0,002 М пиридин-ацетатным буфером (рН 5,4), при ступенчатом элюировании 0,012 и 0,060 М пиридин-ацетатными буферами. Последние достижения в области применения DEAE-анионообменников связана с использо-

ванием сшитой агарозы (Pharmacia и Bio-Rad), которая обеспечивает разделение полисахаридов с гораздо большей молекулярной массой.

7.2.5. Стерическая эксклюзионная хроматография

Более 20 лет назад после появления первых сообщений, посвященных стерической эксклюзионной хроматографии (СЭХ)*, возник большой интерес к применению данного метода для фракционирования декстранов [113, 114], что впоследствии, как и следовало ожидать, привело к его интенсивному использованию почти во всех областях химии углеводов. Практическая значимость этого метода обусловлена не только возможностью эффективного разделения олиго- и полимеров, но и определения с его помощью молекулярно-массового распределения. Теоретические основы СЭХ в настоящее время подробно изучены и рассмотрены в огромном количестве обзоров [115—120]. Опубликованы также обзоры, которые содержат сведения, касающиеся непосредственного использования этого метода в химии углеводов [121, 122]. Поэтому в данном разделе рассмотрены главным образом последние достижения в области СЭХ, которые привели к такому повышению скорости и эффективности разделения, что с недавнего времени этот метод рассматривается в качестве одной из разновидностей ВЭЖХ.

7.2.5.1. Анализ молекулярно-массового распределения

Несмотря на существование нескольких теоретических подходов к интерпретации результатов СЭХ и ряда соответствующих уравнений, связывающих молекулярные массы (или их средние значения) с хроматографическими параметрами макромолекул, для оценки молекулярной массы с помощью данного метода обычно используется простая линейная зависимость между объемом элюирования V_e и $\lg M$ (где M — молекулярная масса или, в случае полимеров, одно из средних значений — \bar{M}_w или \bar{M}_n). Это эмпирическое соотношение получило теоретическое объяснение в работе Андерсона и Стоддарта [123], чей подход справедлив также по отношению к зависимости между $\lg M$ и коэффициентом распределения K_{av} , что было с успехом использовано при анализе молекулярно-массового распределения декстранов [124, 125].

* Этот термин предпочитают использовать вместо термина «гель-хроматография», так как значительная часть сорбентов, применяемых в настоящее время, не является гелями.

Для калибровки колонок необходимо наличие серии соединений с известной молекулярной массой или достаточно хорошо охарактеризованных узких фракций полимеров, которые, кроме того, должны иметь структурное сходство с исследуемыми веществами, что иногда создает дополнительные трудности при анализе углеводов. При изучении декстранов это препятствие преодолимо, так как доступны декстрановые фракции, которые можно использовать в качестве стандартов (Pharmacia Fine Chemicals). Для этой цели пригодны и гораздо более полидисперсные фракции декстранов, но в данном случае необходимо вводить соответствующие поправки [125, 126]. В отсутствие подходящих стандартов для калибровки колонок при анализе молекулярно-массового распределения других полисахаридов часто применяют декстраны фирмы Pharmacia. Однако следует подчеркнуть, что при анализе полисахаридов, структурно отличающихся от декстранов, на результаты калибровки можно опираться при условии, что соотношение между молекулярной массой и молекулярным размером исследуемого полимера имеет тот же порядок, что и для декстрана. «Универсальная калибровка», в основе которой лежит определение зависимости между V_e и $\lg M \cdot [\eta]$ (где $[\eta]$ — истинная вязкость, которая служит мерой гидродинамического объема молекулы в растворе) [127], может быть использована только в случае достаточно длинной полимерной цепи. Так, было показано, что данные калибровки не могут считаться достоверными для декстранов с \bar{M}_w ниже 70 000 [128]. Несмотря на непрекращающиеся попытки [129, 130] найти некую общую зависимость, справедливую для всех полисахаридов, калибровку колонок по охарактеризованным фракциям исследуемого полисахарида, видимо, не удастся заменить. Выделение узких фракций для определения их характеристик (такими методами, как ультрацентрифугирование, светорассеяние и др.) требует применения препаративной СЭХ, которую раньше считали медленным процессом. Однако появление в последнее время сорбентов, которые могут быть использованы в условиях высокоскоростной жидкостной хроматографии, должно в значительной степени сократить время подобного рода препаративного фракционирования.

7.2.5.2. Сорбенты для стерической эксклюзионной хроматографии

Первые сорбенты, предназначенные специально для СЭХ, представляли собой сшитые декстрановые гели (сефадекс серии G, Pharmacia), различающиеся по пористости. Использование таких гелей позволяет хроматографировать полисахариды с молекулярной массой до 200 000. Для фракционирования по-

полисахаридов большей молекулярной массы применяют обычно агарозные гели (сефарозу фирмы Pharmacia или биогели серии А фирмы Bio-Rad), которые также различаются по пористости и могут быть использованы для разделения полисахаридов с молекулярной массой от $<10^4$ до $>10^7$. Однако, несмотря на то что агарозные и декстрановые гели нашли широкое применение в хроматографии углеводов, они имеют существенный недостаток: их углеводная матрица обуславливает иногда появление пиков, не соответствующих разделяемым веществам. То же самое относится и к гелям на основе сшитой целлюлозы [131] и крахмала [34], которые исследовались в некоторых лабораториях. Поэтому углеводы обычно предпочитают хроматографировать на неуглеводных гелях, из которых наибольшей популярностью пользуются полиакриламидные (биогели серии Р, Bio-Rad). Так, например, биогели Р-2 и Р-4 с успехом используют для фракционирования гомологичных олигосахаридов (разд. 7.2.5.3), а на биогеле Р-300 проведено разделение полисахаридов с \bar{M}_w от 5000 до 10 000 [132].

Жесткие гели типа биогеля Р-2, которые практически не меняют своих свойств при значительном повышении давления, можно использовать в качестве сорбентов при ВЭЖХ, тогда как более мягкие гели, например биогель Р-300, теряют в этих условиях механическую прочность. Большое число работ, выполненных в последнее время, посвящено исследованию возможности применения для фракционирования полисахаридов более жестких сорбентов, не изменяющих своих характеристик при высоких давлениях. Наиболее перспективным в этом направлении является, по всей видимости, использование таких неорганических сорбентов* как стекло или силикагель, каждый из которых можно получить в виде гранул строго определенного размера. Наибольшего прогресса следует, по-видимому, ожидать в направлении применения в качестве сорбента пористого стекла (если будет решена проблема адсорбции [135] путем дезактивации полярных центров [136]), так как комбинирование сорбентов с различным размером пор позволяет существенно расширить диапазон фракционирования соединений [136, 137]. Данные о такого рода разделениях приведены в табл. 7.3, в которой сравниваются между собой области фракционирования декстранов на стеклянном сорбенте с контролируемым размером пор [137] и на смеси сефадексов [124]. Показано также, что полисахариды с \bar{M}_w до $\sim 10^7$ можно разделить на стеклянных сорбентах с подходящим размером пор [136].

Для пористого силикагеля, так же как и для пористого стек-

* Попытки использовать для этой цели органические сорбенты, в частности гидрофилизованный полистирол, не привели к успеху [133, 134].

Таблица 7.3. Фракционирование декстранов на сефадексе и пористом стекле

На смеси сефадексов G-200 и G-100 [124] ^а		На носителе из стеклянных шариков с контролируемым размером пор [137] ^б	
\overline{M}_w	K_{av}	\overline{M}_w	K_{av}
147 000	0,04	287 000	0,042
96 000	0,064	163 000	0,114
76 000	0,085	74 800	0,235
58 000	0,110	54 100	0,306
48 300	0,148	51 400	0,323
36 000	0,215	30 200	0,425
32 400	0,227	22 400	0,495
27 800	0,266	16 800	0,566
22 400	0,316	13 100	0,615
19 300	0,380	8 500	0,688
13 200	0,476	5 700	0,736
10 000	0,556	3 300	0,806
7 500	0,620	2 600	0,829
6 100	0,671	1 900	0,866
5 400	0,719	1 000	0,917

^а В соотношении 1 : 2 (сухая масса).

^б Носитель SPG-10: семь типов пористого стекла (75, 125, 175, 240, 370, 700 и 1250 Å) смешаны в соотношении, обратном объему пор.

ла, характерна значительная жесткость и устойчивость к термической, химической и бактериологической деструкции [138]. Исследования возможности использования пористого силикагеля (после дезактивации адсорбционных центров [139, 140]) в качестве сорбента для СЭХ показали его высокую эффективность в разделении декстранов и гликозаминогликанов [141—143]. В настоящее время доступны силикагели (лихросфер, Merck, и порасил, Waters) с такой пористостью, которая обеспечивает фракционирование полисахаридов с \overline{M}_w до $2 \cdot 10^6$. Использование микрогранулированных силикагелей (5 и 10 мкм) должно привести к повышению эффективности разделения до величины, характерной для ВЭЖХ (разд. 7.2.2.1). В последнее время разработаны такие сорбенты для СЭХ, в которых силикагель модифицирован химически связанной инертной фазой, что позволяет избежать трудностей, обусловленных наличием адсорбционных эффектов, свойственных пористому силикагелю. Недавно, например, описано применение колонки, заполненной сорбентом μ -бондагель (Waters), являющимся тонкоизмельченным порасилом (10 мкм), модифицированным присоединением простого полиэфира, для высокоэффективной СЭХ декстранов [144] и гиалуроновой кислоты, а также продуктов ее разложения [145]. В настоящее время продолжается исследова-

ние других сорбентов с привитой фазой, пригодных для быстрого фракционирования полисахаридов [146, 147].

Некоторые из недавно появившихся «полужестких» полимеров находят ограниченное применение в СЭХ из-за того, что их можно использовать только в области средних давлений при комнатной температуре. Например, сополимер 2-оксиэтилметакрилата и этилендиметакрилата, известный как сферон [148], оказался вполне приемлемым сорбентом для разделения декстранов с \bar{M}_w до 500 000 [149]. Сшитый поливинилацетат (меркогель OR-PVA, Merck) использовали для СЭХ замещенных углеводов в органических растворителях [150]; в тех же условиях возможно разделение на сшитых полистиролах (например, поракель, Waters). Перечисленные выше сорбенты по своим свойствам дополняют мягкие гели сефадекса LH-20 и LH-60 (гидроксипропилированные декстрановые гели), которые также находят применение для фракционирования замещенных углеводов.

7.2.5.3. Элюенты и условия хроматографирования

Вода может быть использована в качестве элюента для СЭХ углеводов только в том случае, если условия хроматографирования обеспечивают минимальные взаимодействия (обусловленные электростатическими или вандерваальсовыми силами) молекул растворенного вещества с сорбентом или друг с другом. Роль адсорбции при хроматографии олигосахаридов на жестких сшитых гелях, например на биоцеле Р-2 и сефадексе G-15, была детально изучена Брауном с сотр. [151—155] и Дельвигом и др. [156]. Эти авторы показали, что главным фактором, особенно при анализе декстрановых гелей, является взаимодействие растворенного вещества с гелем, интенсивность которого повышается с увеличением длины цепи в гомологичных сериях (например, в ряду мальто-, целло-, ксило- и маннодекстринов). Сила такого рода взаимодействия падает с повышением температуры, что приводит также к уменьшению коэффициента распределения K_d для каждого олигомера, причем заметнее всего изменения температуры сказываются на хроматографических характеристиках олигомеров с высокой молекулярной массой, которые имеют самые низкие значения K_d . Таким образом, с повышением температуры увеличиваются различия в значениях K_d для членов гомологичных серий олигосахаридов, что приводит, следовательно, к повышению эффективности разделения.

В последнее время нейтральные олигосахариды обычно фракционируют на жестких сшитых полиакриламидных гелях в воде при температуре колонки 55—65 °С. В этих условиях на колон-

ке, наполненной биогелем Р-2, можно разделить смесь мальтодекстринов с СП до 12—13 [157—159] и ксилодекстринов с СП до 18 [4]. Использование несколько более пористого биогеля Р-4 позволяет повысить верхний предел области фракционирования до СП 15 для мальтодекстринов [160] и для изомальто-олигосахаридов, образующихся при гидролизе декстранов [161], а также для продуктов восстановления олигосахаридов обоих типов [161]. Все описанные выше разделения были проведены на гелях с размером частиц >400 меш и 1—2-метровых колонках (две метровые последовательно соединенные колонки) при скорости элюирования 10—30 мл/ч. Эти условия были разработаны в результате детального изучения влияния различных факторов на эффективность разделения мальтодекстринов [159].

Биогель Р-2 и другие сорбенты, имеющие достаточно высокую механическую прочность, можно использовать в хроматографических системах типа ВЭЖХ с детектированием углеводов с помощью автоматизированного колориметрического метода [98] или, если позволяет природа элюента, с помощью дифференциального рефрактометра [159, 160, 162]. Такого рода системы находят все более широкое применение в СЭХ углеводов, особенно при анализе смесей олигосахаридов.

При СЭХ углеводов, содержащих кислотные или основные группировки, вода не всегда является удовлетворительным элюентом, так как электростатические взаимодействия, влияние которых не может быть подавлено с помощью повышения температуры, в данном случае проявляются значительно сильнее. Такого рода осложнения не сопровождают фракционирование олигосахаридов, содержащих только остатки аминодезоксисахаров. Олигосахариды этого класса, образующиеся, например, при гидролизе хитина, можно разделить препаративно методом СЭХ на колонке с биогелем Р-2 [163] или с сефадексом LH-20 [164] в воде, однако, если присутствуют кислые остатки сахаров, как, например, в олигосахаридах из гликозаминогликанов, электростатические взаимодействия приобретают существенное значение, что обычно приводит к ухудшению качества разделения [163, 165]. Однако использование в качестве элюента растворов электролитов позволяет успешно фракционировать кислые олигосахариды на колонках, наполненных биогелем Р-2 или сефадексом G-25. Оптимальную концентрацию электролита в элюенте, необходимую для подавления электростатических взаимодействий, нужно определять для каждого конкретного случая. Так, например, Флодин и др. [166] для разделения ди-, тетра-, гекса- и октасахаридов, образующихся при ферментативном гидролизе гиалуроновой кислоты, использовали в качестве элюента 0,1 М NaCl, тогда как для фракционирования соответствующих олиго-

сахаридов, полученных из хондронтин-4-сульфата, потребовалась 1 М концентрация NaCl [166]. Наиболее подходящим элюентом для хроматографии олигосахаридов из гепарина на колонке с сефадексом G-25 оказалась 0,01 М уксусная кислота [167], в то время как для разделения олигосахаридов из гиалуроновой кислоты на колонке с биогелем Р-2 в качестве элюента предложена 25%-ная (~4 М) уксусная кислота [163]. Оптимальным элюентом для препаративной хроматографии является водный раствор летучей соли: например, продукты гидролиза гиалуроновой кислоты до додекасахарида включительно были разделены на колонке с сефадексом G-50 в элюенте, содержащем 0,25 М ацетат пиридиния (рН 6,5) [168], а олигосахариды молока, включающие остатки N-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты), можно фракционировать в 1 М ацетате пиридиния (рН 4,4) на колонке с сефадексом G-25 [169].

При хроматографии полисахаридов и высших олигосахаридов предпочтительным является использование элюентов с высокой ионной силой для предотвращения ассоциации молекул хроматографируемых веществ и их взаимодействия с сорбентом. Данный прием приобретает особое значение в анализе молекулярно-массового распределения, при проведении которого рекомендуется в качестве элюента 0,3%-ный [124] или 0,9%-ный раствор NaCl [125]. Однако наиболее широкое применение для этой цели находит 1 М NaCl [132, 170—173], использование которого для элюирования колонок с полиакриламидными и агарозными гелями обычно обеспечивает достаточную воспроизводимость хроматографических данных. Полученные таким образом результаты можно использовать при анализе олигосахаридов, образующихся при избирательном расщеплении изучаемых полисахаридов [171—173].

СЭХ гликозаминогликанов и гликопротеинов представляет особую трудность из-за варьирования форм и размеров молекул в зависимости от рН и ионной силы элюента [174—176]. Однако при использовании растворов NaCl удовлетворительные результаты можно получить даже при разделении гексозаминогликанов [177—179], хотя при хроматографии как гексозаминогликанов, так и гликопротеинов обычно рекомендуется дополнительное буферирование элюентов [145, 180, 181].

Применяющиеся для фракционирования полисахаридов мягкие гели, такие, как биогель Р-300 и сефадекс G-200, обеспечивают максимальную скорость элюирования, не превышающую ~3 мл/ч, тогда как появившиеся недавно жесткие носители позволяют поднять скорость подачи элюента примерно до 1 мл/мин [144, 182], что сокращает время анализа до 1 ч, но, с другой стороны, приводит к некоторому ухудшению качества разделения [183].

7.2.6. Аффинная хроматография

В последние годы все более широкое применение в химии углеводов находит важный и относительно новый метод, известный под названием аффинной хроматографии. Этот метод включает использование носителей с лигандами, имеющими значительное сродство к молекулам с определенной стереохимией. Лиганд, который в данном случае представляет собой лектин (гемагглютинирующий гликопротеин), ковалентно присоединяется к нерастворимой матрице, обычно агарозной или полиакриламидной природы. При хроматографии полисахариды или гликопротеины, содержащие группировки, связывающиеся с лектином, удерживаются на подобного рода носителях и таким образом отделяются от других компонентов, которые быстро проходят через колонку. Связанные с носителем соединения далее можно десорбировать путем элюирования колонки раствором низкомолекулярного углевода, содержащего группировку, специфически связывающуюся с лектином. Тот же эффект достигается при изменении pH или ионной силы элюента с тем, чтобы разрушить образовавшийся ранее комплекс адсорбированного соединения с иммобилизованным лектином.

Первым лектином, который нашел применение для хроматографии углеводов, был конканавалин А (из канавалии мечевидной *Canavalia ensiformis*), который представляет собой металлопротеин, содержащий Mn^{2+} и Ca^{2+} , чье присутствие необходимо для проявления связывающей активности. Этот лектин имеет сильное сродство к α -D-маннопиранозильным и α -D-глюкопиранозильным остаткам [184] и осаждает полисахариды, содержащие достаточное число терминальных остатков данных типов [185]. В 1970 г. появилось сообщение о том, что продукт, полученный присоединением конканавалина А к агарозному гелю, приобретает способность адсорбировать полисахариды в количестве, пропорциональном содержанию терминальных α -маннопиранозильных или α -D-глюкопиранозильных остатков в молекуле полимера [186, 187]. Так, например, сильно разветвленный декстран прочно удерживался на данном носителе, тогда как декстраны с небольшим числом разветвлений практически не адсорбировались на нем, поскольку содержали значительно меньше α -D-глюкопиранозильных терминальных групп [186]. В результате дальнейших интенсивных исследований было установлено, что любые изменения при C-3, C-4 или C-6 в остатке моносахарида, участвующего в связывании, существенным образом сказываются на степени комплексообразования с конканавалином А, тогда как даже значительные вариации при C-2 гораздо меньше отражаются на эффективности связывания. Так, например, полисахариды, содержащие терминаль-

ные остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы и α -(1 \rightarrow 2)-связанные остатки D-маннопиранозы, все еще в заметной степени проявляли сродство к конканавалину А [188]. Из этих результатов следовало, что конканавалин А способен связывать большое число полисахаридов и гликопротеинов. В последние годы широкое применение для выделения и очистки данных биополимеров нашла конканавалин А-сефароза (Pharmacia), представляющая собой носитель, в котором лектин ковалентно присоединен к агарозному гелю — сефарозе 4В [189]. Дальнейшее изучение связывающих свойств конканавалин А-сефарозы продолжается и в настоящее время [190].

При аффинной хроматографии на конканавалин А-сефарозе стартовый буфер должен иметь рН около 7 и содержать хлорид натрия: обычно используют 0,02 М трис-НСl-буфер, рН 7,4, содержащий 0,5 М NaCl [189]. Адсорбированные на носителе соединения можно количественно элюировать с колонки раствором, содержащим α -метил-D-маннопиранозид или α -метил-D-глюкопиранозид [186, 187]. Градиентное элюирование (0 \rightarrow 0,5 М метилгликозид) целесообразно применять в тех случаях, когда связи адсорбированных соединений с носителем носят прочный характер, однако для большинства веществ обычно вполне достаточна 0,2 М концентрация метилгликозида [189]. Другая методика, включающая элюирование колонки боратным буфером (0,1 М борат натрия, рН 6,0), имеет то преимущество, что избыток борной кислоты можно легко удалить из целевого продукта превращением в летучий метилборат [181]. В некоторых случаях для регенерации адсорбированных соединений используют буфер с низким рН (но не ниже 3) [189].

К настоящему моменту известно значительное число лектинов, обладающих сродством к определенным остаткам сахаров. Детальный обзор последних достижений в этой области составлен Голдштейном и Хайесом [192]; некоторые примеры приведены в табл. 7.4. Из данных таблицы следует, что в аффинной хроматографии находит применение довольно значительное число лектинов, присоединенных к подходящей матрице, причем некоторые из подобного рода носителей уже производятся рядом фирм. Например, фирма Pharmacia предлагает чечевиный лектин, связанный с сефарозой 4В, а также лектин из проростков пшеницы и из *Helix pomatia*, присоединенные к сефарозе 6МВ. Аффинная хроматография особенно эффективна при изучении гликопротеинов; обзор исследований, проведенных в этом направлении, составлен Кристиансеном [193]. Однако данный метод находит применение и для выделения различных полисахаридов. Сильное сродство лектина тридакнина из моллюска *Tridacna maxima* к полисахаридам, содержащим терминальные β -D-галактопиранозильные остатки [194], было использовано

Таблица 7.4. Углеводсвязывающая специфичность лектинов

Источник лектина	Углеводная специфичность	Литература
<i>Canavalia ensiformis</i> (канавалия мечевидная)	α -D-Manp > α -D-Glcp > α -D-GlcpNAc	[184—192]
<i>Lens culinaris</i> (чечевица)	α -D-Manp > α -D-Glcp, α -D-GlcpNAc	[189], [192]
<i>Triticum vulgare</i> (проростки пшеницы)	β -D-GlcpNAc; β -(1→4)-связанные олигомеры (олигосахариды из хитина) имеют большее сродство	[189], [192], [196]
<i>Helix pomatia</i> (виноградная улитка)	α -D-GalpNAc \gg α -D-GlcpNAc	[192], [197]
<i>Dolichos biflorus</i> (горох)	α -D-GalpNAc \gg α -D-GlcpNAc	[192], [198]
<i>Glycine max</i> (соя)	α -D-GalpNAc > β -D-GalpNAc \gg \gg α -D-Galp	[192], [199]
<i>Sophora japonica</i> (софора японская)	β -D-GalpNAc > β -D-Galp > α -D-Galp	[192], [200]
<i>Tridacna maxima</i> (моллюск)	β -D-GalpNAc > β -D-Galp	[194], [195]
<i>Ricinus communis</i> (клещевина обыкновенная)	β -D-Galp > α -D-Galp	[192], [201—203]
<i>Crotalaria juncea</i> (конопля)	β -D-Galp > α -D-Galp	[203—204]
<i>Lotus tetragonolobus</i> (спаржа)	α -L-Fucp	[192], [205]
<i>Ulex europaeus</i> (утесник обыкновенный)	α -L-Fucp	[192], [206]

для выделения арабиногалактана, связанного с белком (из *Gla-diolus*). Хроматографирование проводили на колонке с носителем, полученным присоединением этого лектина к сефарозе 4В, что демонстрирует потенциальные возможности метода аффинной хроматографии при изучении растительных полисахаридов [195]. Некоторые примеры исследований в этом бурно развивающемся направлении приведены в табл. 7.4.

7.2.7. Методы детектирования при колоночной хроматографии

В настоящее время для детектирования незамещенных углеводов при ВЭЖХ наиболее часто используется проточный рефрактометр, однако в ближайшем будущем следует ожидать более широкого распространения УФ-детекторов, работающих в области от 190 нм и обеспечивающих детектирование свободных сахаров [207, 208]. Чувствительность такого УФ-детектора к моносахаридам приблизительно в 12 раз выше, чем у большинства рефрактометров (предел обнаружения ~ 20 мкг сахара). Следует также учитывать, что с повышением степени полимеризации

зации исследуемых соединений чувствительность рефрактометрического метода падает. УФ-детектор (260 нм) позволяет детектировать нанограммовые количества подходящим образом защищенных (бензоилированных [16] или 4-нитробензоилированных [19]) сахаров. Для других хроматографических систем, которые, в частности, включают ионный обмен или СЭХ, перспективы описанных выше методов детектирования ограничены невозможностью использования элюентов с высоким содержанием солей [209, 210]. Так, например, описана система, в которой углеводсодержащие соединения, элюирующиеся с анионообменной колонки, давали поглощающие УФ хромофоры в реакции с концентрированной серной кислотой [211]. Предложен также другой метод детектирования, основанный на восстановлении Ce^{4+} под действием восстанавливающих сахаров до флуоресцирующего иона Ce^{3+} [212]. Однако чувствительность этих методов недостаточно высока для того, чтобы рекомендовать их в качестве общих методов детектирования углеводов.

Известно несколько стандартных колориметрических методов количественного определения углеводов [213], которые могут быть использованы в сочетании с автоматизированными аналитическими системами для детектирования углеводов, вымываемых с различного рода колонок. В первоначальном варианте углеводного анализатора фирмы Technicon [74] реализован орцин-серноокислотный метод [73], который включает динамическое смещение реагента с элюатом, поступающим с колонки, при помощи перистальтического многоканального насоса. Поток жидкости, разделенный пузырьками воздуха, проходит затем через нагревательную баню и после удаления пузырьков воздуха поступает в кювету проточного колориметра (420 нм). Предел обнаружения по сахарам для этой системы составляет около 10^{-8} моль. Использование насосов, изготовленных из кислотоустойчивых материалов и обеспечивающих прецизионную подачу реагента (и, следовательно, низкий уровень «шума» нулевой линии), позволило отказаться от разделения потока жидкости пузырьками воздуха, что привело к значительному повышению чувствительности автоматизированного орцин-серноокислотного метода детектирования сахаров (в случае пентоз $1 \cdot 10^{-10}$ моль, в случае гексоз $3 \cdot 10^{-10}$ моль) [214]. Такого рода насосы в настоящее время широко используются в аналитических системах данного типа [80, 98].

Недостаток орцин-серноокислотного метода заключается в том, что нестойкость реагента к нагреванию вызывает осаждение на стенках нагревательных трубок окрашенного материала. Это приводит к образованию препятствий на пути потока жидкости и как следствие к повышению уровня «шума». Антрон-серноокислотный метод [215], который в автоматическом варианте

[216] широко используется для анализа декстрановых фракций в элюате с заполненных гелями колонок [124], также не лишен этого недостатка; более того, в присутствии хлорид-ионов, которые часто содержатся в буферах для СЭХ полисахаридов, уменьшается интенсивность окраски хромогена, образующегося в результате данной реакции. До сих пор не потерял своего значения метод обнаружения углеводсодержащих соединений во фракциях, полученных при хроматографических разделениях; реакцией с фенолом и серной кислотой, впервые предложенный Дюбуа и др. [217]. Эта простая методика, для проведения которой требуются доступные и устойчивые реагенты, остается стандартным методом колориметрического детектирования углеводов в хроматографических системах, не поддающихся полной автоматизации. Все попытки автоматизировать этот метод натолкнулись на препятствия, связанные с возникновением нежелательных пульсаций и выделением в процессе реакции неконтролируемого количества теплоты при смешении 98%-ной серной кислоты с водными растворами в замкнутой системе [218]. γ -Цистеин-сернокислотный метод, лишенный недостатков описанных выше процедур, удалось автоматизировать [219] и создать на его основе прекрасную систему детектирования для анионообменной [78] и стерической эксклюзионной хроматографии [220] углеводов. Более специфический аналитический метод детектирования углеводов, содержащих значительные количества остатков уроновых кислот (например, кислые гексозаминогликаны), включает реакцию такого рода соединений с карбазолом и серной кислотой [221]. Показано, что этот метод также может быть автоматизирован [220, 222].

Необходимость применения агрессивных реагентов с высоким содержанием серной кислоты создает серьезные трудности на пути создания автоматизированных аналитических систем. Этим обусловлена разработка альтернативных методов детектирования сахаров, в основе которых лежит использование их восстанавливающих свойств. Моппер и Дигенс изучили возможность применения реакции восстановления тетраэзольного синего до диформаза в щелочной среде для детектирования сахаров с помощью автоматической системы, включающей распределительную хроматографию на анионообменной смоле в водно-спиртовой среде [65] (разд. 7.2.3). Данный метод, характеризующийся высокой чувствительностью (предел обнаружения 0,1 нмоль), тем не менее не может быть рекомендован в качестве стандартной процедуры, так как предполагает использование элюентов, непременно содержащих этанол, который обеспечивает растворимость образующегося в процессе реакции диформаза. Более универсальным в этом отношении представляется медь-бицинхонинатный метод, предложенный

впоследствии Моппером и Джиндлером [66], в основе которого лежит превращение Cu^{2+} под действием восстанавливающего сахара в Cu^+ и последующее комплексообразование образующегося однозарядного катиона с 2,2'-бицинхонинатным анионом, которое сопровождается появлением глубокой лиловой окраски (максимум поглощения при 562 нм). Так как присутствие этанола способствует повышению интенсивности окраски данного хромогена, особенно высокой чувствительностью отличаются автоматизированные хроматографические системы, в которых используются элюенты, содержащие этанол [67]. Однако в настоящее время медь-бицинхонинатный метод после некоторой модификации [99] успешно применяется в системах, включающих ионообменную хроматографию нейтральных сахаров в боратных буферах [81], кислых сахаров в элюентах, содержащих ацетат-ион [95], и аминодезоксисахаров в цитратных буферах [223], причем во всех случаях предел детектирования не превышает 1 нмоль. Преимуществом этого аналитического метода при анализе аминодезоксисахаров в гидролизатах гликопротеинов является то, что в отличие от традиционного нингидринового метода, который предполагает детектирование любых соединений, содержащих свободную аминогруппу, в данном случае определяются исключительно аминодезоксисахара. Рекомендуются также автоматизированная система детектирования восстанавливающих сахаров при ионообменной хроматографии, в основе которой лежит образование окрашенного комплекса (максимум поглощения при 460 нм) в присутствии неокупроина и ионов Cu^+ [224]. Сочетание данной аналитической процедуры с автоматическим периодат-пентан-2,4-дионовым методом анализа восстановленных производных сахаров [55, 85, 219] позволило успешно решить проблему одновременного определения сахаров и полиолов [100]. Комбинирование аналитических методов, предназначенных для детектирования строго определенных классов углеводов, позволило создать несколько многоцелевых хроматографических систем [101, 220].

7.3. Газожидкостная хроматография

Со времени появления первого сообщения о применении ГЖХ для разделения производных углеводов в 1958 г. [225] появилось огромное количество публикаций, посвященных разработке этого направления. В настоящее время метод ГЖХ занимает одно из наиболее важных мест в методологии химии углеводов. Количество работ в этой области поистине громадно и имеет устойчивую тенденцию к дальнейшему росту, что делает необходимым публикацию с короткими интервалами подробных обзоров. Прекрасный обзор Даттона, состоящий из двух частей

[226, 227], охватывает период с 1963 по 1972 г. Некоторые специальные аспекты этой проблемы освещены в важных публикациях, появившихся между 1970 и 1972 гг. [228—236], и в нескольких более поздних работах [237, 238]. В настоящем разделе основное внимание уделено обзору достижений в данной области после 1972 г., а также рассмотрению наиболее ценных аспектов ранних сообщений, которые в полной мере обсуждались в цитированных выше обзорах.

7.3.1. Общие экспериментальные условия

Жидкую неподвижную фазу для разделения необходимо в каждом конкретном случае подбирать экспериментальным путем, причем целесообразно исследовать поведение каждого нового летучего производного на нескольких фазах, различающихся по полярности. При рассмотрении производных углеводов особенно трудно давать общие рекомендации, касающиеся выбора жидкой фазы для ГЖХ, так как полярность летучих производных сахаров, зависящая от их структурных особенностей, различается в довольно широких пределах. Например, несмотря на то что фаза средней полярности — силикон ХЕ-60 (25% цианэтильных и 75% метильных остатков) не подходит для разделения триметилсилиловых эфиров частично метилированных полиолов [239], которые лучше разрешаются на неполярных фазах OV-101, SE-30 (100% метилсиликонов) и SE-52 (5% фенил-, 95% метилсиликона), эту фазу можно использовать с большим успехом, чем SE-30, для разделения триметилсилильных производных гексуроновых кислот и их лактонов [240]. В некоторых случаях, особенно при анализе смесей метилированных сахаров, целесообразно исследовать каждый образец с помощью двух различающихся по полярности фаз, так как производные, имеющие близкие времена удерживания на одной фазе, могут быть разделены с использованием другой, и наоборот. Например, Аспиналл [241] применял для разделения большого числа полностью и частично метилированных метилгликозидов колонки с полибутандиолсукцинатом, а также с менее полярной фазой на основе полифенилового эфира. Янссон и др. [242] рекомендуют последнюю из перечисленных фаз (OS-138) для анализа некоторых частично метилированных ацетатов полиолов (особенно ацетатов 2,3-ди-О-метилрамнита и 2,3,4,6-тетра-О-метилсорбита), которые не разделяются на обычно применяемой для этой цели более полярной фазе ECNSS-M (сополимер полиэтиленгликольсукцината и цианалкилсиликона). В насадочных колонках природа твердого носителя заметным образом сказывается на характере ГЖХ-разделения. Существенным для анализа триметилсилильных производных углеводов является дезактивация диатомового носителя промыванием кислотой и силанизацией

[243]. В основном носители такого рода (хромосорб WAWDMCS и газохром Q, обычно 100—120 меш) рекомендуются для ГЖХ углеводов. Необходимо, однако, заметить, что в случае некоторых ацетатов полиолов лучшие результаты наблюдаются при использовании необработанного хромосорба W [244]. Аналогичные данные были получены Даттоном и Уолкером [226, 226, 245] при изучении некоторых ацетатов метилированных полиолов. Недавно появилось сообщение, что прекрасные результаты разделения как ацетильных, так и триметилсилильных производных метилированных полиолов и ацетамидо-дезоксиполиолов могут быть получены при использовании носителя с низким содержанием (0,3—0,4%) жидкой фазы OV-225. Для этого носитель (хромосорб W) предварительно модифицировали путем нанесения на его поверхность полиэтиленгликоля (карбовакса 20 М) с последующей термической обработкой (280 °C в атмосфере азота) и многократной экстракцией метанолом [247]. Для разделения ацетатов метиловых эфиров 2-дезоксид-2-(N-метил)ацетамидо-D-сорбита предпочтительным оказалось использование в качестве носителя стеклянных шариков (GLC 110), покрытых 0,05% ECNSS-M [248].

Несмотря на то что с помощью насадочных колонок стандартных размеров (длиной около 2 м и внутренним диаметром 0,3—0,6 мм) могут быть получены вполне удовлетворительные результаты, капиллярные колонки, имеющие более высокую разрешающую способность и позволяющие существенно сократить время разделения, обладают несомненными преимуществами, особенно при исследовании сложных смесей, образующихся, например, при анализе полисахаридов методом метилирования. Прекрасные результаты разделения метилированных сахаров в виде их ацетатов полиолов получены Линдбергом с сотр. [228, 242] на открытой капиллярной колонке с пористым слоем (15 м×0,5 мм), содержащей ECNSS-M или более новую фазу OV-225. Еще более эффективного разделения этих производных удалось достичь при помощи открытой капиллярной колонки (25 м×0,25 мм) с непористым слоем (фаза SP-1000) [242]. Использование таких колонок (разрешающая способность до 10^5 теоретических тарелок) позволило решить проблему разделения энантиомерных D- и L-форм некоторых сахаров в виде их хиральных модифицированных гликозидов (разд. 7.3.3.7) [249]. Аналогичные результаты были получены при разделении энантиомеров на капиллярных колонках (25 м×0,31 мм) со стенками, покрытыми SE-30 [250, 251].

Интервал температур, в котором обычно проводят ГЖХ углеводов, составляет в большинстве случаев 140—250 °C. Часто, особенно если анализируемые соединения сильно различаются по молекулярной массе, предпочтительным является программ-

рование температуры. Наглядным примером, характеризующим возможности использования программирования температуры при ГЖХ, может служить хорошее разделение триметилсилильных производных некоторых полиоксисоединений, в смеси которых присутствовал, с одной стороны, тетрит (эритрит), а с другой — тетрасахарид (стахиоза). Для анализа такой смеси потребовалось всего 23 мин (повышение температуры от 160 до 240 °С со скоростью 10 °С/мин, от 240 до 350 °С со скоростью 30 °С/мин и 11 мин при 350 °С) [252]. Использование таких высоких температур предполагает, очевидно, тщательный подбор жидкой фазы, например описанное выше разделение было проведено на колонке с дексилон 300 GC (*мета*-карборан), устойчивым при температурах до 500 °С. Это — исключительный случай, однако в последнее время прослеживается тенденция к замене жидких фаз, которые обычно использовались для ГЖХ производных углеводов, фазами с большей термической стабильностью. Вследствие этого анализ можно проводить в более широком интервале температур без риска столкнуться с «утечкой» жидкой фазы с колонки, что необходимо полностью исключать особенно в том случае, когда хроматограф является составной частью хроматомасс-спектрометра. Например, фаза ECNSS-M, которая в течение длительного времени рекомендовалась для ГЖХ ацетатов полиолов [253] и их частично метилированных производных [254], устойчива лишь до температуры 200 °С, а выше 180 °С обнаруживает тенденцию к «утечке». Поэтому в последнее время предпочитают использовать фазу OV-225 (25% цианпропил-, 25% фенил- и 50% метилсиликона), которая имеет сходные характеристики с ECNSS-M, но обладает более высокой термической стабильностью (до 275 °С) [255]. Фаза OV-17 (50% фенил- и 50% метилсиликона) устойчива при температурах до 300 °С, что позволяет проводить анализ углеводов не только в виде ацетатов полиолов [256, 257], но и в виде триметилсилиловых эфиров, что особенно важно в случае олигосахаридов [258].

При ГЖХ производных углеводов в качестве газа-носителя обычно используют гелий или азот; хроматограф в большинстве случаев оборудован пламенно-ионизационным детектором. При введении в молекулу сахара сильно электроотрицательных атомов, как, например, при трифторацетилировании, можно использовать более чувствительный детектор электронного захвата, с помощью которого удастся анализировать смеси трифторацетатов моносахаридов на пикограммовом уровне [259]. Азотсодержащие соединения, такие, как, например, аминодезоксисахара или производные нейраминовой кислоты, можно детектировать термоионным азот-фосфорным селективным детектором, для которого коэффициент селективности составляет около

100 [260], а чувствительность по аминодезоксисахарам почти в 5 раз выше, чем у стандартного пламенно-ионизационного детектора.

7.3.2. Идентификация и количественное определение компонентов

Аналитическая ГЖХ позволяет провести предварительную идентификацию компонентов по их временам удерживания относительно подходящего внутреннего стандарта, однако относительные времена удерживания необходимо подтвердить путем использования заведомо известных образцов предполагаемых соединений. Не вызывает сомнения, что, основываясь на одних только данных ГЖХ, нельзя провести положительную идентификацию соединений; для окончательного подтверждения правильности отнесения пиков на хроматограмме к определенным веществам необходимо привлечение других аналитических методов в сочетании с ГЖХ. Для этой цели чрезвычайно широко используется масс-спектрометрия. К настоящему времени опубликовано значительное число работ, посвященных ГЖХ-масс-спектрометрии углеводов (разд. 7.3.4). Применение систем, в которых масс-спектрометр присоединен к газовому хроматографу, представляется в высшей степени целесообразным, но отнюдь не обязательным: например, сообщается о прекрасных результатах, полученных даже в том случае, когда оба прибора физически были разделены [261]. Так как углеводы не обладают высокой летучестью, получение их в чистом виде на выходе газового хроматографа не представляет больших трудностей [262]. Выделенные таким образом соединения могут быть охарактеризованы не только масс-спектрометрически, но и с помощью других спектральных методов; в частности, съемка спектров кругового дихроизма полностью ацетилированных полиолов позволяет определить абсолютную конфигурацию исходных моносахаридов [263].

Для количественного определения содержания компонентов в смеси, анализируемой при помощи ГЖХ, измеряют площади под соответствующими пиками на хроматограмме и затем подсчитывают их соотношение. Площади пиков исследуемых соединений необходимо определять относительно площади пика внутреннего стандарта, известное количество которого прибавляют к смеси перед хроматографированием. Внутренний стандарт должен быть химически родствен анализируемым соединениям и давать один-единственный пик, не совпадающий с любым другим пиком на хроматограмме, причем предпочитают такой стандарт, чтобы соответствующий ему пик располагался вблизи средней точки хроматограммы. Для длительных разделений ре-

комендуют использование нескольких внутренних стандартов. Пики, соответствующие внутренним стандартам, служат дополнительными точками для математической обработки результатов и помогают обнаружить любые изменения условий в процессе хроматографирования. В качестве внутренних стандартов для ГЖХ триметилсилильных производных сахаров и гликозидов рекомендуются [229—231] различные полиолы (арабит, маннит и мио-инозит) в виде соответствующих производных. Молярный коэффициент отклика для каждого конкретного соединения определяют путем калибровки с помощью известных количеств данного соединения совместно с внутренним стандартом. Чтобы оценить содержание исследуемого компонента в смеси, площадь пика, отвечающего этому соединению, делят на определенный ранее молярный коэффициент отклика. Следует отметить, что воспроизводимость значений коэффициентов отклика невысока, и поэтому их необходимо определять довольно часто, причем в тех же экспериментальных условиях, в которых проводился анализ [226, 227]. Первоначально предполагалось, что молярные коэффициенты отклика одинаковы для большинства метилированных ацетатов полиолов, однако в сообщении Свита и др. [264] это положение было опровергнуто. Таким образом, очевидно, что при количественном анализе углеводов методом ГЖХ нельзя обойтись без тщательного определения коэффициентов отклика независимо от типа исследуемых производных.

7.3.3. Производные

7.3.3.1. Метилированные метилгликозиды

В химии углеводов ГЖХ была впервые использована для разделения полностью метилированных метилгликопиранозидов D-ксилозы и L-арабинозы, а также для анализа аналогичных производных D-глюкозы, D-галактозы и D-маннозы [225]. Анализ проводили на колонке с апиезоном М на целите 545 (1:4) при 170 °С. Метилгликозиды в процессе хроматографирования не подвергались ни аномеризации, ни гидролизу, что было доказано их выделением в неизменном виде из потока газа-носителя на выходе из хроматографа. Вслед за выяснением принципиальной возможности разделения производных сахаров вскоре последовали сообщения о детальной разработке этого метода [265, 266], который быстро стал основным инструментом анализа частично, а также полностью метилированных метилгликозидов. Успешное разделение аномеров [266], а также отделение фуранозидов от пиранозидов [267] показало, что ГЖХ-метод может найти применение для анализа метанолизатов при структурном изучении полисахаридов. Детальные исследования в этом направ-

лении провели Аспиналл [241] и Стефен и сотр. [268], которые опубликовали данные о временах удерживания большого числа метилированных метилгликозидов, полученных из *l*-арабинозы, *D*-ксилозы, *l*-рамнозы, *l*-фукозы, *D*-глюкозы, *D*-галактозы, *D*-маннозы, *D*-фруктозы, а также из сложных метиловых эфиров *D*-глюкуроновой и *D*-галактуроновой кислот. Как указывалось выше, Аспиналл [241] при проведении исследования был вынужден использовать две фазы (разд. 7.3.1): эффективное разделение полностью метилированных метилгликозидов и гликозидов, содержащих лишь одну гидроксильную группу, удалось осуществить на колонке с полибутандиолсукцинатом при 175 °С, тогда как менее замещенные производные, например гликозиды ди-*O*-метилгексоз, прочно удерживались этой фазой, и для их разделения пришлось перейти к менее полярному полифениловому эфиру (при 200 °С). Стефен [268] рекомендовал для подобного рода разделений в качестве неподвижной фазы полиэтиленгликольсукцинат (при 165 °С), что позволило одновременно анализировать как высокозамещенные гликозиды, так и производные ди-*O*-метилгексоз. Эта неподвижная фаза (14% на хромосорбе W, 80—100 меш) нашла широкое применение для анализа метанолизатов полисахаридов [269] и кислых олигосахаридов, выделенных в процессе структурного исследования полисахаридов [6, 270].

Другие исследования в области ГЖХ частично метилированных гликозидов были связаны в основном с попытками улучшения разделения различных метилированных производных отдельных сахаров. Так, например, Оводов и Павленко [271] опубликовали данные о временах удерживания некоторых метилированных производных метил-*D*-галактопиранозида и метил-*D*-фуранозида на полинеопентилгликольсукцинате (5% на хромосорбе W, 60—80 меш) при 167 °С. Та же самая фаза (2%) при 190 °С была использована в работе, посвященной идентификации производных ди-, три- и тетра-*O*-метил-*D*-маннозы методом ГЖХ [272]. Аналогичное исследование с целью определения времен удерживания 3-*O*-метил- и некоторых ди-*O*-метил-*D*-глюкопиранозидов, а также три- и тетра-*O*-метилпроизводных было проведено Хейнсом и др. [273] с использованием 5% полиэтиленгликольсукцината при 200 °С. Для того чтобы уменьшить времена удерживания моно- и ди-*O*-метилгексозидов, было проведено ацетилирование свободных гидроксильных групп: сообщается [274], например, о разделении четырех изомерных моно-*O*-метиловых эфиров α -метил-*D*-маннопиранозида на ECNSS-M (3% на хромосорбе W, 60—80 меш) при 170 °С или полибутандиолсукцината (5% на хромосорбе W, 80—100 меш) при 195 °С после предварительного полного ацетилирования этих высокополярных соединений. Частично метилиро-

ванные метилпентозиды и метил-6-дезоксигексозиды разделяются с помощью ГЖХ более легко, чем производные гексоз. Так, например, опубликованы данные о временах удерживания всех метилированных производных О-метил- β -ксилофуранозидов на нескольких фазах [275, 276], среди которых ХЕ-60 (5%, при 160 °С) обладает, по-видимому, оптимальными характеристиками для ГЖХ данных соединений. Для разделения метиловых эфиров α -метил- β -рамнопиранозидов рекомендуется фаза ECNSS-M (3%) в следующем температурном режиме: 8 мин при 110 °С и далее повышение температуры до 150 °С со скоростью 2 °С/мин [277].

Несомненным преимуществом использования метилгликозидов в качестве летучих производных для ГЖХ частично метилированных сахаров является возможность изучения с помощью этого метода метилированных производных урановых кислот в виде сложных метиловых эфиров метилгликозидов. Андерле и Ковач [278] опубликовали результаты определения времен удерживания всех возможных метиловых эфиров метил(α -метил- β -глюкопиранозид)уронатов на нескольких фазах, наиболее эффективной из которых оказалась ХЕ-60 (4% на газохроме Z, 80—100 меш) при 175 °С. Однако для этих производных, содержащих свободные гидроксильные группы в молекуле, характерна необратимая адсорбция на колонках, и поэтому предпочтение отдается их ацетилированным аналогам. В этом случае прекрасные результаты разделения были получены на полибутандиолсукцинатной фазе (5% на газохроме Z) при 190 °С. Разделение метилированных сахаров в виде их метилгликозидов имеет недостаток, связанный со сложностью получаемых хроматограмм, что обусловлено возможностью существования сахаров в изомерных формах, отличающихся размером оксидного цикла и конфигурацией гликозидного центра. Однако в том случае, если исследуемая смесь содержит небольшое количество метилированных гликозидов, недостаток метода можно расценивать как его преимущество: наличие нескольких пиков, относящихся к одному моносахариду, облегчает его идентификацию.

7.3.3.2. Ацетилированные полиолы

При анализе методом ГЖХ сложных смесей сахаров возникает необходимость упростить хроматограмму. Это можно осуществить удалением аномерного центра в каждом сахаре, что приводит к ситуации, когда одному соединению соответствует один пик на хроматограмме. Наиболее простой способ решения этой задачи состоит в боргидридном восстановлении сахаров до соответствующих полиолов, которые при ацетилировании дают

производные, достаточно летучие для ГЖХ-анализа. Ценность этого подхода была впервые продемонстрирована в 1960 г. Бишопом и Купером [265], которые сумели разделить моно-О-метилловые эфиры D-глюкозы. Путем восстановления и последующего ацетилирования эти соединения превращали в производные, которые хроматографировали на апиезоне М. Успешное разделение всех четырех изомерных производных D-глюкозы стимулировало интерес к ГЖХ-анализу незамещенных сахаров в виде ацетатов полиолов, и уже в 1961 г. появилось сообщение о разделении полностью ацетилированных производных некоторых полиолов (от глицерина до октитолов) при помощи ГЖХ (при 213°C) с использованием смесей полярной (полибутандиолсукцинат) и неполярной (апиезон М) фаз [279, 280]. Однако тексаацетаты дульцита и D-сорбита в этих условиях имели одинаковые времена удерживания. Этот факт наряду с несомненной трудностью приготовления описанных выше смешанных фаз задержал распространение данного метода до тех пор, пока не появилась новая фаза — силикон-полиэфирный сополимер, известный под названием ECNSS-M, с помощью которого удалось [253] провести разделение полностью ацетилированных полиолов всех обычных моносахаридов, включая глюкозу и галактозу. Предложенные в работе [253] условия (3% ECNSS-M на газохроме Q, 100—120 меш, при 190°C) вскоре стали общепринятыми для анализа ацетатов полиолов. В настоящее время этот метод широко используется при анализе смесей сахаров.

Из-за ограничений, связанных с термической нестабильностью (разд. 7.3.1), ECNSS-M постепенно вытесняется другими фазами с более высокой устойчивостью, например OV-17 [256] и в особенности OV-225 [256, 257, 281], которые в последнее время нашли широкое применение для разделения полностью ацетилированных полиолов. Сообщается об одновременной идентификации нейтральных и аминодезоксисахаров в виде ацетатов полиолов в гидролизатах гликопротеинов методом ГЖХ на фазе OV-225 (1% на хромосорбе GHP, 80—100 меш) при программировании температуры от 170 до 230°C со скоростью 1°C/мин [281]. В другой работе [282] эта фаза (3% на газохроме Q, 100—120 меш) использовалась для разделения полностью ацетилированных мальтита и лактита при 260°C. Другой фазой, стабильной при более высоких температурах, чем ECNSS-M, является полинеопентилгликольсебакат, который был использован Перри и Уэббом для ГЖХ всех 2-амино-2-дезоксигексоз в форме 2-ацетамидо-1,3,4,5,6-пента-О-ацетил-2-дезоксиглицитов, большинство из которых разделяются на этой фазе при 240°C (10% на хромосорбе WAW, 80—100 меш) [283]. К недостаткам этого метода следует отнести то, что уроновые кислоты нельзя идентифицировать без предварительной хими-

ческой модификации, включающей восстановление карбоксильных групп [284].

Основной сферой применения данного метода является анализ смесей частично метилированных сахаров. При этом могут быть получены относительно простые хроматограммы, так как каждому метиловому эфиру соответствует на хроматограмме только один пик. Характер распределения метильных групп в ацетатах полиолов легко определяется методом масс-спектрометрии. По этой причине ацетаты полиолов являются, по-видимому, самыми удобными производными для ГЖХ-масс-спектрометрического изучения метилированных сахаров (разд. 7.3.4). Эту область применения ацетатов полиолов интенсивно исследовали Линдберг с сотр. [228, 242, 254], а также Лёнгрен и Пилотти [255], которые опубликовали данные о временах удерживания большого числа частично метилированных ацетатов полиолов, полученных из всех нейтральных моносахаридов, обычно встречающихся в полисахаридах, а также нескольких дидезоксисахаров, обнаруженных в бактериальных полисахаридах. Эти исследователи на первом этапе своей работы использовали фазу ECNSS-M (3% на газохроме Q, 100—120 меш) при 170—180°C [228, 254], в дальнейшем перешли к анализу на OV-225 (в тех же условиях) [255], а затем на капиллярных колонках (SP-1000, 220°C) [242]. Другой неподвижной фазой, которую можно рекомендовать для ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов, является OV-17 (3% на хромосорбе WAW, 80—100 меш, при 170°C). Использование этой фазы позволяет идентифицировать производные 2,4,6-три-О-метил-Д-глюкозы и 3,4,6-три-О-метил-Д-маннозы [257], которые не разделяются на ECNSS-M или OV-225. Среди других фаз, которые иногда применяются для более сложных разделений, необходимо упомянуть бутандиолсукцинат [261], апиезоны [285] и смесь циансиликоновых фаз OV-275 и XF-1150 [286]. Программирование температуры обычно благоприятно сказывается на эффективности разделения [286, 287].

Перри и Уэбб [288] привели результаты определения времен удерживания метиловых эфиров 2-амино-2-дезоксид-глюкозы в виде ацетилированных производных 2-ацетамидо-2-дезоксид-сорбита на полиэфирной фазе (неопентилгликольсебакат) в условиях, аналогичных тем, которые они использовали для разделения полностью ацетилированных ацетамидодезоксиполиолов [283]. Ацетаты метиловых эфиров 2-дезоксид-2-(N-метил)-ацетамидо-Д-сорбита и 2-дезоксид-2-(N-метил)-ацетамидо-Д-дульцита были изучены Штеллером и др. [289], которые использовали для этой цели фазу ECNSS-M в стандартных условиях, предложенных Бьёрндалом и др. [228]. Как указывалось выше (разд. 7.3.1), более успешное разделение этих производных

удалось провести на шариках из стекла в качестве носителя для фазы ECNSS-M [248].

Существенным вкладом в развитие химии углеводов явился предложенный недавно Свитом и др. [290] метод этилирования, который значительно обогатил традиционный подход к структурному изучению полисахаридов методом метилирования. Этими авторами опубликованы данные о временах удерживания большого числа частично этилированных ацетатов полиолов, полученных из целого ряда моносахаридов (L-арабинозы, D-ксилозы, L-рамнозы, L-фукозы, D-глюкозы, D-галактозы и D-маннозы), часто встречающихся в полисахаридах клеточных стенок растений. В этом исследовании были использованы четыре колонки для ГЖХ, две из которых применялись ранее (в аналогичных условиях) для изучения соответствующих частично метилированных ацетатов полиолов, полученных из тех же сахаров [287]. Проведенное таким образом прямое сравнение производных этих классов показывает, что многие моносахаридные компоненты полисахаридов, которые невозможно разделить в виде ацетатов частично метилированных полиолов, можно проанализировать с помощью ГЖХ в форме соответствующих частично этилированных производных, и наоборот. ГЖХ-масс-спектрометрия частично метилированных и частично этилированных ацетатов полиолов, которые образуются в результате гидролиза, восстановления и ацетилирования полностью алкилированных олигосахаридов, выделенных с помощью ВЭЖХ (разд. 7.2.2.2), является составной частью нового важного метода структурного анализа полисахаридов, недавно предложенного Валентой и др. [41].

7.3.3.3. Полностью метилированные полиолы

Разделение методом ГЖХ полностью метилированных полиолов, полученных из обычных моносахаридов, было описано Оводовым и Евтушенко [291], а также Уайтом [292]. В первой работе сообщалось о неудовлетворительном разделении таких производных, особенно пар арабит — ксилит и сорбит — маннит, на апиэзоне L при температуре 138°C, тогда как сообщение Уайта содержало результаты успешного анализа производных всех полиолов, за исключением метилированных арабита и ксилита, на трифторпропилметилсиликоне QF-1 (3% на газохроме Q) при 110°C. Однако в случае моносахаридов использование такого рода производных, по-видимому, нецелесообразно, учитывая невысокую степень разрешения при ГЖХ и довольно большие затраты времени на получение полностью метилированных полиолов. Этот метод оказался гораздо более полезным при изучении олигосахаридов, так как он включает образование

относительно летучих соединений, которые можно исследовать методом масс-спектрометрии. Керкяйнен [293] предложил использовать метод исчерпывающего метилирования для ГЖХ-масс-спектрометрического изучения дисахаридов, включая дисахариды, содержащие остатки аминодезоксигексоз [293, 294], и большого числа трисахаридов [295]. В случае полностью метилированных восстановленных дисахаридов наиболее высокая эффективность разделения была достигнута на фенилметилсиликоновой фазе OV-22 (1%, температура 197 °C) [293]. Эта фаза, сохраняющая стабильность вплоть до температуры 300 °C, была также с успехом использована для разделения производных трисахаридов (при 265 °C). Разделение полностью метилированных гексопиранозил-2-ацетамидо-2-дезоксигекситов было проведено на фазе QF-1 (3%) при температуре 220 °C [294].

7.3.3.4. Ацетилированные альдононитрилы

Альтернативой боргидридному восстановлению сахаров с последующим ацетилированием является превращение их в ацетаты альдононитрилов. В результате этих превращений, как и в случае ацетатов полиолов, происходит исчезновение аномерного центра сахара, что приводит к существенному упрощению ГЖХ-хроматограмм. Ацетаты альдононитрилов получают путем нагревания сахаров сначала с хлоргидратом гидроксиламина в пиридине в течение 30 мин, а затем после охлаждения и обработки реакционной смеси уксусным ангидридом еще в течение 30 мин. Продуктом первой стадии процесса является оксим сахара, который на второй стадии подвергается дегидратации с одновременным ацетилированием всех свободных гидроксильных групп. ГЖХ сахаров в виде ацетатов альдононитрилов имеет то преимущество, что каждая альдоза дает характеристическое производное, что не всегда возможно в случае превращения сахаров в ацетаты полиолов. Так, например, арабиноза и ликсоза дают идентичный полиол; то же самое происходит в случае 2-О-метил- и 4-О-метил-D-ксилозы. Ланс и Джонс [296] в 1967 г. впервые продемонстрировали возможность использования ацетатов альдононитрилов в ГЖХ на примере успешного разделения трех изомерных моно-О-метиловых эфиров D-ксилозы. Впоследствии Дмитриев и др. [297] исследовали поведение при ГЖХ ацетатов альдононитрилов, полученных из большого числа сахаров и их метиловых эфиров, и показали, что эти производные с успехом могут быть использованы при анализе гидролизатов олиго- и полисахаридов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. Этот перспективный подход вызвал повышенный интерес многих исследователей. К настоящему времени опубликованы исчерпывающие данные о временах удерживания О-аце-

тил-О-метил- D-глюкононитрилов [298, 299] и О-ацетил-О-метил-маннонитрилов [300, 301]. Результаты данных исследований были использованы Сеймуром и другими для ГЖХ-масс-спектрометрического анализа при структурном изучении декстранов [299] и α -D-связанных маннанов [302].

Сеймур и др. [303] описали также условия ГЖХ полностью ацелированных альдононитрильных производных большого числа моносахаридов от тетроза до гептозы, включая ацетамидодезоксигексозы. Оптимальной эффективности разделения удалось добиться с использованием полинеопентилгликольсукцината (3% на хромосорбе W, 60—80 меш) при программировании температуры от 140 до 250 °C со скоростью 3 °C/мин. В этих условиях не разделились только две пары производных — из D-рибозы и L-фукозы, а также из D-маннозы и D-талозы. Неподвижные фазы и условия разделения, предложенные различными авторами для ГЖХ ацетатов альдононитрилов сахаров и их метиловых эфиров, сходны с используемыми при разделении соответствующих ацетатов полиолов. Так, Моррисон [256] для разделения полностью ацелированных альдононитрильных производных обычных сахаров использовал ECNSS-M (3% на газохроме Q, 100—120 меш) при 185 °C, OV-225 (5% на хромосорбе WAWDMCS, 100—120 меш) при 210 °C и OV-17 (3% на супсорбе AWDMS, 100—120 меш) также при 210 °C. В большинстве случаев полностью ацелированные производные полиолов сильнее удерживаются на колонке, чем соответствующие ацетаты альдононитрилов в тех же условиях, что позволяет проводить анализ смесей, содержащих оба типа производных, на одной колонке. Это наблюдение послужило основой для создания метода оценки длины цепи поли- и олигосахаридов по молярному соотношению количеств ацелированного полиола и ацелированного альдононитрила, найденных при помощи ГЖХ производных, получаемых путем восстановления и гидролиза полимера с последующим превращением образующихся при этом сахаров в ацетаты альдононитрилов [256, 304]. Методы количественного анализа моносахаридного состава полисахаридов и гликопротеинов с помощью ГЖХ в виде ацетатов альдононитрилов получили дальнейшее развитие в работах Вармы с сотр. [305—309]. В настоящее время эти производные могут рассматриваться в качестве ценной альтернативы ацетатам полиолов в такого рода исследованиях.

7.3.3.5. Триметилсилильные производные

Первое сообщение об использовании триметилсилиловых эфиров сахаров в качестве летучих производных для ГЖХ появилось в 1960 г. [310]. Впоследствии Ферье [311] удалось улуч-

шить разделение на фазах, используемых в цитируемой выше работе (апиэзоны), проводя хроматографирование при более низкой температуре (180 °C); в этих условиях возможно разделение аномеров некоторых моносахаридов. Дальнейший интерес к этому методу поддержан работой Смита и Карлссона [312], которые изучили возможность его использования для количественного анализа. Однако лишь после появления в 1963 г. классического исследования Свили и др. [313] ГЖХ-анализ сахаров в виде триметилсилильных производных получил всеобщее признание в качестве стандартного метода изучения углеводсодержащих соединений. Основное преимущество этого метода заключается в скорости и относительной простоте получения производных. Способ триметилсилилирования, предложенный в работе [313] и пользующийся популярностью до настоящего времени, обычно обеспечивает полную защиту всех свободных гидроксильных групп в течение 5 мин. Этот способ включает последовательную обработку углеводного материала, растворенного или суспендированного в сухом пиридине, гексаметилдисилазаном и триметилхлорсиланом с последующим встряхиванием или, в случае ограниченно растворимых соединений, обработкой ультразвуком [226, 227]. После этого смеси дают постоять при комнатной температуре в течение необходимого времени и затем вводят непосредственно в газовый хроматограф. Модификации, предложенные различными авторами, включают, например, замену пиридина по окончании реакции триметилсилилирования другим растворителем (рекомендуется гексан [314]) в тех случаях, когда наличие уширенного ГЖХ-пика пиридина мешает анализу легколетучих соединений. При работе с малорастворимыми в пиридине веществами вместо него рекомендуют использовать диметилсульфоксид [315]. При возникновении трудностей с соблюдением безводных условий (например, при изучении кукурузных паток), как того требует методика Свили, триметилхлорсилановый катализатор можно заменить трифторуксусной кислотой [316]. Другим силилирующим агентом, относительно малочувствительным к присутствию влаги, является N-(триметилсилил)имидазол, который не теряет своей активности даже в водных растворах сахаров или полиолов [137]. Однако для решения большинства задач первоначально предложенная методика остается наилучшим способом триметилсилилирования углеводов.

В цитируемой выше работе Свили и др. [313] представлены результаты определения времен удерживания большого числа сахаров и родственных соединений в виде их триметилсилильных производных как на полярной (15% полиэтиленгликольсукцината на хромосорбе W, 80—100 меш), так и на неполярной фазе (3% SE-52 на силанизированном хромосорбе WAW, 80—

100 меш). Для моносахаридов, в особенности для альдогексоз, более эффективное разделение наблюдалось на полярной фазе. Это наблюдение в дальнейшем получило развитие в работе Савардекера и Слопекера [318], использовавшими карбовакс 20 М, а также в исследовании Эллиса [243], который в результате изучения ряда жидких фаз пришел к заключению, что ХЕ-60 (1% на силанизированном хромосорбе WAW, 60—80 меш) является наилучшей фазой для разделения обычных моносахаридов в форме их триметилсилильных производных. При всех анализах температура колонки составляла примерно 140°C. В дальнейшем [319], используя более высокие температуры (170—180°C), удалось улучшить разделение моносахаридных производных на фазах SE-52 и SE-30 (в обоих случаях 10% на силанизированном хромосорбе WAW, 80—100 меш), причем было показано, что разделению смесей альдоз, кетоз и дезоксисахаров в форме их триметилсилильных производных на SE-52 благоприятствует программирование температуры; этот прием приобретает особое значение, если в исследуемой смеси присутствуют олигосахариды. Свили и др. [313] обнаружили, что для разделения дисахаридов в виде их триметилсилильных производных на SE-52 достаточна температура 210°C, тогда как в случае три- и тетрасахаридов требуется повышение температуры до 250°C. Программирование температуры (от 125 до 250°C со скоростью 2,3°C/мин, затем в изотермическом режиме при 250°C) позволяет за 75 мин разделить смесь 20 компонентов от тетроз (эритроза) до трисахаридов (раффиноза и меллицитоза). Эти же авторы описали неудачную попытку разделения олигосахаридов на сложнотетрафазной фазе, которая, как и ожидалось, не обладает достаточно высокой термической стабильностью (устойчива до 200°C). Для решения данной проблемы необходимо использовать силиконовые фазы, эффективность которых не уменьшается до температуры 300°C, или даже более термостабильные фазы, например дексил 300 GC [252], упоминавшийся в разд. 7.3.1 [258, 320], SE-30 [229, 321, 322] и SE-52 [230, 313, 316], которые при правильном выборе температурной программы обеспечивают разделение большого числа триметилсилильных производных углеводов, вплоть до тетрасахаридов [316], в течение менее чем 1 ч.

Преимущество использования триметилсилиловых эфиров в качестве летучих производных для ГЖХ углеводов перед другими методами заключается главным образом в возможности превращения в эти производные сахаров всех классов, включая аминодезокси- и ацетамидодезоксисахара [229, 313, 322—324], а также уроновые кислоты [240, 322, 325] и их многочисленные производные: лактоны [240, 325], альдоновые кислоты и альдонолактоны [313, 325—328], альдаровые кислоты [325, 328] и

сложные метиловые эфиры метилгликозидов [322, 325]. N-Ацильные производные нейраминовой кислоты (N-гликолил- и более часто встречающаяся N-ацетилнейраминовая кислоты) также разделяли в виде их триметилсилиловых эфиров [260, 322]. В этой связи необходимо отметить, что времена удерживания на SE-30 указанных производных были такими же, как и для соответствующих триметилсилилированных сложных метиловых эфиров метилгликозидов [260]. Метилгликозиды аминоксидокси- и ацетамидоксидоксисахаров также могут быть разделены с помощью ГЖХ в форме их триметилсилильных производных на SE-30 и OV-17 [260, 322—324], которые, как указывалось выше, обеспечивают эффективное разделение аналогичных производных нейтральных сахаров [322, 329]. Таким образом, метод, включающий метанолиз и последующее триметилсилилирование, представляет несомненный интерес для анализа гликопротеинов, гликозаминогликанов и полисахаридов клеточных стенок бактерий, так как все моносакхаридные компоненты этих полимеров могут быть определены одновременно в форме триметилсилилированных производных метилгликозидов [229, 260, 322, 330—332]. Для таких разделений необходимо программирование температуры в диапазоне 80—250 °С.

Некоторые частично метилированные метилгликозиды, например ди-О-метилгексозиды, не могут быть удовлетворительно разделены с помощью ГЖХ, однако триметилсилилирование их свободных гидроксильных групп зачастую приводит к значительному улучшению разделения: в частности, данный подход рекомендуется для ГЖХ ди-О-метиловых эфиров метил-*D*-маннозида (на неопентилгликольсукцинате на хромосорбе W, 80—100 меш, при 136 °С) [272]. В этом сообщении приведены, кроме того, результаты определения времен удерживания триметилсилиловых эфиров ди-, три- и тетра-О-метил-*D*-манноз в аналогичных условиях. Было изучено поведение при ГЖХ О-триметилсилил-О-метиловых эфиров *D*-глюкозы [333] и *D*-ксилозы [334]. Горин и Магус [335] сообщили о временах удерживания триметилсилиловых эфиров некоторых метилированных производных 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактопиранозы, образования которых следует ожидать при анализе методом метилирования природных полимеров, содержащих данные моносакхариды [335]. В этом исследовании в качестве неподвижной фазы использовали неопентилгликольсебакат при 140 °С. Возможность применения ГЖХ для изучения характера замещения ацилнейраминовых кислот при метилировании исследована Хаверкампом и др. [336], которые использовали фазу SE-30 (4%) при 220 °С.

При анализе методом ГЖХ гидролизатов и метанолизатов углеводсодержащих соединений в виде триметилсилильных про-

изводных каждому компоненту соответствует на хроматограмме не один пик, что связано с возможностью образования в процессе гидролиза или метанолиза пиранозных и фуранозных форм, каждая из которых, кроме того, может присутствовать в виде смеси изомеров, различающихся конфигурацией аномерного центра. В случае, например, метилированных метилгликозидов такие характеристики, как число, положение и интенсивность пиков, могут оказаться полезными для идентификации индивидуальных соединений. Но при исследовании сложных смесей обычно необходимо упростить картину хроматографического разделения. Для этого перед триметилсилилированием проводят восстановление сахаров до полиолов, однако этот прием не получил широкого распространения в анализе смесей, содержащих только пентозы и гексозы, так как соответствующие полиолы плохо разделяются в форме триметилсилильных производных [231, 313]. Хорошее разделение наблюдается для триметилсилиловых эфиров низших полиолов: этиленгликоля, глицерина, треита и эритрита, имеющих меньшие времена удерживания, чем аналогичные производные пентоз, гексоз и их метилгликозидов. На этой основе был разработан удобный метод количественного определения одновременно полиолов и сахаров или гликозидов в продуктах избирательного разложения углеводовсодержащих полимеров, которое включает периодатное окисление с последующим боргидридным восстановлением и мягким кислотным гидролизом (распад по Смитсу) в случае полисахаридов [337, 338] или метанолизом для гликопептидов [339]. Однако основной областью применения триметилсилилированных полиолов является анализ смесей частично метилированных сахаров, которые в большинстве случаев можно успешно разделить в виде триметилсилиловых эфиров производных полиолов [239, 246, 335, 340, 341]. Рекомендуется также восстановление олигосахаридов перед триметилсилилированием, особенно при анализе методом ГЖХ-масс-спектрометрии [342].

Принимая во внимание неудовлетворительный характер разделения триметилсилилированных пентитов и гекситов, а также неопределенности, возникающие в тех случаях, когда два различных моносахарида дают один и тот же полиол (разд. 7.3.3.4), восстановление не является оптимальным способом упрощения хроматограмм при ГЖХ-анализе смесей незамещенных моносахаридов в форме их триметилсилиловых эфиров. Моррисон и Перри [343] предложили для решения этой проблемы использовать окисление альдоз до соответствующих альдоновых кислот с последующей лактонизацией. Большинство альдоз дает только 1,4-лактон, и при ГЖХ в форме триметилсилиловых эфиров в каждом случае получается единственный соответствующий ему пик, тогда как при окислении D-глюкозы образуется как 1,4-, так

и 1,5-лактон, каждому из которых отвечает пик на хроматограмме. Среди наиболее часто используемых производных следует отметить также оксимы [313, 327] и О-метилоксимы [344], получаемые в тщательно контролируемых условиях при обработке сахаров соответственно хлоргидратом гидроксилamina или хлоргидратом О-метилгидроксилamina в пиридине. Хотя триметилсилилированные оксимы и О-метилоксимы некоторых сахаров выходят в виде двух пиков, что обусловлено различиями в хроматографической подвижности *син*- и *анти*-изомеров, тем не менее хроматограммы в данном случае проще, чем при анализе циклических сахаров. Описано использование такого рода производных для разделения альдоз и кетоз [327], включая низшие [327, 345], а также дисахаридов [346, 347]. Триметилсилилированные оксимы и О-метилоксимы дают характерные масс-спектры и поэтому все чаще используются для ГЖХ-масс-спектрометрического анализа сахаров.

Условия проведения ГЖХ и времена удерживания производных сахаров для некоторых разделений представлены в табл. 7.5.

7.3.3.6. Трифторацетаты

Трифторацетилирование углеводов обычно проводят путем их обработки трифторуксусным ангидридом [347] или N-метилбис-(трифторацетамидом) [349] в пиридине или дихлорметане [350]. Полученные таким образом легколетучие производные можно успешно использовать в ГЖХ-анализе особенно при наличии детектора электронного захвата [259]. Первым о возможности использования трифторацетилированных производных для анализа пентоз, гексоз, аминодезоксисахаров, метилгликозидов и олигосахаридов сообщил Вилкас и др. [351] в 1966 г. В дальнейшем всесторонние исследования хроматографического поведения трифторацетатов различных гексопиранозидов и гексофуранозидов на нескольких фазах было проведено Йошидой и др. [329]. Сопоставление результатов разделения трифторацетатов обычных моносахаридов и аминодезоксисахаров с данными ГЖХ-анализа в аналогичных условиях трифторацетилированных производных соответствующих метилгликозидов показало несомненное преимущество последних. На основании этого было сделано предположение, что метод с использованием в качестве летучих производных трифторацетатов метилгликозидов можно с успехом применять для анализа продуктов метанолиза гликопротеинов и полисахаридов [350]. Разделения проводили на силиконовой фазе средней полярности (50% трифторпропиловых и 50% метильных групп) OV-210 (5% на варапорте 30) при программировании температуры от 90 до 190°C со скоростью

Таблица 7.5. ГЖХ производных сахаров^а

Исходный сахар	Относительное время удерживания						
	Производные						
	Полностью ацетилированные				Триметилсилильные		
	Полиолы		Альдоонитрилы		Эфиры		Оксимы
	I	II	III	IV	V		VI
D-Эритроза	0,26	—	1,00	1,00	—	0,20; 0,23	
L-Арабиноза	1,00	1,00	2,54	2,35	0,31	0,53	
D-Ксилоза	1,38	1,24	2,79	2,50	0,45; 0,57	0,55	
D-Рибоза	0,89	—	2,29	2,25	0,36; 0,37	0,60	
D-Ликсоза	1,00	—	2,43	2,35	0,31; 0,38	—	
L-Рамноза	0,57	—	1,89	2,15	0,33; 0,42	0,68	
L-Фукоза	0,63	0,76	2,29	2,35	0,35; 0,39; 0,45	0,69	
D-Галактоза	3,03	2,27	3,89	3,75	0,72; 0,80; 0,90	1,43; 1,57	
D-Глюкоза	3,50	2,43	3,75	3,65	0,86; 1,13	1,55	
D-Манноза	2,61	2,11	3,50	3,55	0,66; 0,89	1,45	
D-Талоза	—	—	3,50	3,55	0,74; 0,78; 0,91	—	
D-Аллоза	—	—	3,39	3,40	0,72; 0,76; 0,82	—	
L-Идоза	—	—	4,03	3,90	—	—	
D-Гулоза	—	—	—	—	0,65; 0,71; 1,00	—	
D-Альтроза	—	—	—	—	0,64; 0,67; 0,82	—	
D-Фруктоза	—	—	—	—	—	1,13	
2-Амино-2-дезоксид-D-глюкоза	—	4,7	—	—	0,79; 0,92	—	
2-Амино-2-дезоксид-D-галактоза	—	5,1	—	—	0,73; 0,83	—	
2-Ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкоза	—	—	6,11	4,45	1,38	—	
2-Ацетамидо-2-дезоксид-D-галактоза	—	—	—	4,90	1,30	—	
N-Ацетилнейраминаовая кислота	—	—	—	—	2,41	—	
D-Глюкуроновая кислота	—	—	—	—	1,07; 1,27	—	
D-Галактуроовая кислота	—	—	—	—	0,82; 1,18	—	

^а Фазы, температурные условия, стандарты, относительно которых подсчитано время удерживания: I — 3% EGNSS-M на газохроме Q, 100—120 меш, 190 °С, пентаацетат арабита [253]; II — 1% OV-225 на хромосорбе GHP, 80—100 меш, 170—230 °С со скоростью 1 °С/мин и 15 мин при 230 °С, пентаацетат арабита [281]; III — 3% неопентилглицероуксидната на хромосорбе W, 60—80 меш, 140—250 °С со скоростью 3 °С/мин, полный ацетат эритрононитрила [303]; IV — 2% OV-17 на хромосорбе WHP, 80—100 меш, 130—300 °С со скоростью 5 °С/мин, полный ацетат эритрононитрила [303]; V — 3% SE-30 на диатопорте S, 80—100 меш, 140—200 °С со скоростью 0,5 °С/мин, триметилсилилированный сорбит [327]; VI — 0,5% OV-17 на хромосорбе G, 100—120 меш, 160 °С, триметилсилилированный сорбит [327].

1 °С/мин. Оказалось, что в таких условиях одновременно можно разделить в форме трифторацетатов О-метилгликозиды большинства встречающихся в природе пентоз, гексоз, аминодезокси- и ацетамидодезоксигексоз, а также сложные метиловые эфиры метилгликозидов D-глюкуроновой и D-галактуриновой кислот. Обсуждаемый метод обеспечивает лучшее разделение этих метилгликозидов, чем при использовании соответствующих триметилсилильных производных, и поэтому получает все более широкое применение при изучении метанолизатов гликопротеинов. Используя детектор электронного захвата [352, 353] и капиллярные колонки с OV-210 [352], можно анализировать субмикрограммовые количества углеводсодержащего материала.

Картину хроматографического разделения можно упростить, восстанавливая сахара до полиолов перед их трифторацетилизацией [350, 352—354], причем в случае трифторацетатов пентитов и гекситов удается добиться удовлетворительных результатов разделения особенно на капиллярных колонках [352, 354]. Тамура и сотр. [355, 356], продемонстрировавшие возможность использования данного метода для быстрого анализа моно- и дисахаридов в крови и моче, опубликовали впоследствии данные ГЖХ-масс-спектрометрического изучения ряда трифторацетилированных полиолов [357]. Этот метод оказался полезным при ГЖХ-анализе частично метилированных сахаров: Андерле и Ковач [348] наблюдали прекрасное ГЖХ-разделение всех четырех моно-О-метил-D-глюкоз в виде трифторацетатов производных полиолов на фазе ХЕ-60 (1%) при программировании температуры от 30 до 150 °С со скоростью подъема температуры 1 °С/мин. Показано также, что метиловые эфиры L-рамнозы можно разделить в виде трифторацетатов полиолов [277].

7.3.3.7. Другие летучие производные

Одним из наиболее значительных достижений последнего времени в области ГЖХ углеводов явилась реализация возможности превращения моносахаридов в гликозиды хиральных спиртов и разделения пар энантиомеров ГЖХ на капиллярных колонках. Для получения таких гликозидов Леонтайн и др. [249] использовали (+)-октанол-2 и после ацетилирования анализировали методом ГЖХ на открытой капиллярной колонке с непористым слоем (фаза SP-1000) в изотермическом режиме при температуре 230 °С. Каждой паре энантиомеров моносахаридов после гликозилирования (с последующим ацетилизацией) соответствовала на хроматограмме группа пиков, анализ положения и формы которых позволил определить абсолютную конфигурацию исследуемых сахаров. Несколькими позднее сходные результаты были получены при изучении триметилсилильных

производных (—)-бутил-2-гликозидов (капиллярная колонка с фазой SE-30 при программировании температуры от 135 до 220 °C со скоростью 1 °C/мин), что позволило использовать этот метод не только для анализа нейтральных сахаров, но и для определения абсолютной конфигурации уроновых кислот и ацетамидодезоксигексоз [250, 251]. Новый метод несомненно представляет собой важный шаг в развитии методологии химии углеводов.

Среди производных, которые также иногда используют в ГЖХ углеводов, можно отметить циклические бутанборонатные эфиры [358, 359], их триметилсилиловые эфиры [360, 361], изопропилиденацетали [362, 363] и триметилсилильные производные диэтилдитиоацеталей [364—366]. Среди них наиболее перспективными, по-видимому, являются диэтилдитиоацетальные производные, в особенности с точки зрения возможности их использования для масс-спектрометрического изучения сахаров. Необходимо подчеркнуть, что при анализе этих производных методом ГЖХ каждому сахару соответствует на хроматограмме один острый пик. Кроме того, имеется возможность превращения в эти производные не только нейтральных сахаров, но и уроновых кислот, а также продуктов дезаминирования аминодезокси-сахаров азотистой кислотой [365, 366].

7.3.4. Использование масс-спектрометрии

Использование масс-спектрометрии в сочетании с ГЖХ играет важнейшую роль при решении многих задач в химии углеводов, особенно при анализе сложных смесей, образующихся в ходе структурного изучения полисахаридов и гликопротеинов. Подавляющее большинство производных углеводов, используемых для анализа методом ГЖХ, изучено с помощью масс-спектрометрии. Результаты изучения характера фрагментации этих производных детально изложены в прекрасных обзорах Кочеткова и Чижова [367, 368], Ханессана [369], а также Лёнгрена и Свенссона [370]. Ценная информация, касающаяся хроматомасс-спектрометрии сахаров, содержится также во всестороннем обзоре Даттона, посвященном ГЖХ углеводов [226, 227].

Наиболее приемлемые методы получения производных для ГЖХ-масс-спектрометрии включают такие превращения сахаров, в процессе которых происходит потеря хиральности при аномерном атоме углерода. Ацетаты полиолов, полученные из частично метилированных сахаров, имеют легко интерпретируемые масс-спектры. Исследование, предпринятое Линдбергом с сотр. [228, 242], в основе которого лежало сопоставление масс-спектров ацетатов частично метилированных полиолов и их дейтерированных по C-1 аналогов [371—373], позволило исключить возмож-

ность появления неопределенности при восстановлении нейтральных сахаров до полиолов. В литературе содержатся также данные о характере фрагментации различных О-метилованных 2-дезоксид-2-(N-метил)ацетамидогексидов [248, 249], ацетилованных альдонитрилов [297, 300, 303], триметилсилилованных оксидов и О-метилоксидов [327, 344]. Данные, полученные [293—295, 342] методом масс-спектрометрии для полностью метилированных восстановленных олигосахаридов и соответствующих триметилсилильных производных, оказали неоценимую помощь в ГХ—МС олигосахаридов.

Хотя масс-спектрометрию электронного удара применяют в большинстве исследований углеводов, масс-спектры химической ионизации, полученные в присутствии таких ионизирующих газов, как аммиак, метан или изобутан, зачастую легче интерпретировать [370] и можно использовать для идентификации соединений, которые имеют сложный характер фрагментации под электронным ударом [374]. Поэтому наиболее полную информацию можно, очевидно, получить при помощи обоих этих методов, взаимно дополняющих друг друга.

7.4. Плоскостная хроматография

7.4.1. Хроматография на бумаге

Хроматографию на бумаге для анализа сахаров впервые предложил Парtridge [375] в 1946 г. Она широко используется в химии углеводов, но в последнее время постепенно вытесняется ТСХ. По этой причине, а также учитывая большое число обзоров [3, 376—380] и глав в хорошо известных книгах [381—384], доступных широкому кругу научных работников, в этом разделе дано лишь краткое обсуждение метода бумажной хроматографии.

Изучение влияния строения сахара на его подвижность на бумаге показало, что значения R_f зависят от числа атомов углерода и их пространственного расположения, а также от степени замещения гидроксильных групп в молекуле сахара [385]. В случае олигосахаридов скорость миграции падает при увеличении числа остатков моносахаридов в цепи. При исследовании олигосахаридов обнаружена линейная зависимость между степенью полимеризации и логарифмом функции α' , которая определяется выражением $R_f/(1-R_f)$ [385], причем наклон прямой, характеризующей эту зависимость, определяется типом моносахарида, входящего в состав олигосахаридов, и конфигурацией гликозидной связи. Такое соотношение справедливо для большинства олигосахаридов, за исключением лишь олигосахаридов [387], полученных из пектина.

Для аналитических целей используют бумагу типа ватман № 1. Препаративные разделения проводят на более толстых листах хроматографической бумаги (ватман № 3ММ или 17). В большинстве случаев предварительная обработка бумаги не является необходимой, однако некоторые разделения существенно улучшаются при использовании бумаги, пропитанной неорганическими комплексообразующими агентами. Этот прием становится чрезвычайно действенным при хроматографии смесей полиолов, а также смесей, содержащих сахара и образующиеся из них полиолы. Зачастую такие смеси, не поддающиеся анализу на обычной бумаге, можно разделить на хроматографической бумаге, предварительно пропитанной боратом или вольфрамом. Анкус и др. [388] исследовали поведение большого числа полигидроксильных соединений, включая сахара, полиолы и циклиты, при хроматографии на бумаге, пропитанной вольфрамом натрия (рН 6 или 8). В частности, была продемонстрирована возможность разделения четырех альдопентоз и соответствующих им трех полиолов, а также D-глюкозы, D-сорбита, D-галактозы и дульцита. Оказалось, что в этих условиях степень разрешения выше, чем при использовании альтернативного метода, который предполагает введение комплексообразующего агента в систему растворителей для хроматографии [389].

Хроматографию углеводов на бумаге проводят обычно в нисходящем и одномерном варианте, хотя известны примеры (в частности, разделение фосфатов сахаров [390]) высокоэффективного использования двумерной хроматографии. Для разделения олигосахаридов со степенью полимеризации выше 6 или 7 предпочитают обычно вариант, включающий многократный последовательный пробег системы растворителей по хроматограмме [391]. Однако описан пример хроматографии изомальтодекстринов со степенью полимеризации до 12 за один пробег на довольно длинной (160 см) полоске хроматографической бумаги, помещенной в специально сконструированную камеру [392]. Время, необходимое для разделения олигосахаридов, составляет обычно от 60 до 120 ч, тогда как хроматография моносахаридов занимает не более 24 ч. На продолжительность анализа существенно влияет пористость бумаги, вязкость системы растворителей и температура. Показано [393], в частности, что при повышенной температуре (обычно 37 °C) хроматография протекает значительно быстрее, а исследуемые соединения мигрируют в виде более компактных пятен.

После окончания хроматографирования бумагу необходимо высушить при комнатной температуре. На данной стадии нагревание (при температуре выше 60 °C) нежелательно, так как оно может вызвать необратимые превращения сахаров. Высушенные хроматограммы или, в случае препаративной хроматографии,

контрольные полосы, вырезанные с краев и из середины хроматограммы, опрыскивают обнаруживающим реагентом (разд. 7.4.3). Положение пятен может быть охарактеризовано значениями R_f , если растворитель не дошел до края бумаги. Когда смоченным оказывается весь лист хроматографической бумаги (вариант разделения на протоке, используемый для разделения смесей сахаров с близкой структурой), положение каждого компонента определяется относительно известного соединения (на той же хроматограмме) и обозначается $R_{\text{стандарт}}$ (например, R_{Gal} означает подвижность относительно галактозы). Учитывая невоспроизводимость значений R , необходимо в каждом случае сопоставлять подвижности исследуемого и стандартного соединения на одной хроматограмме.

Количественное определение сахаров на хроматограмме можно провести методом денситометрии. Так, например, описан способ оценки содержания сахаров в клинических анализах крови и мочи при концентрациях до 10 мкг/мл с точностью ± 2 —3,5% [394]. При препаративной хроматографии на бумаге зоны, соответствующие разделяемым соединениям, вырезают и элюируют водой или 50%-ным этанолом. В результаты любых определений углеводов, выделенных таким образом, следует вносить поправку на присутствие следов целлюлозного материала из бумаги, количество которого можно оценить после элюирования в тех же условиях пустого образца бумаги тех же размеров, что и хроматографическая зона.

Системы растворителей, обычно рекомендуемые для хроматографии на бумаге [3, 381—383, 395, 396], представляют собой тройные смеси, содержащие воду и два органических растворителя, один из которых полностью, а другой ограниченно смешиваются с водой (к первым относятся, например, этанол или пиридин, из растворителей другой группы наиболее часто используют бутанол-1 и этилацетат). Так, Джермин и Ишервуд [395] предложили системы растворителей, содержащие этилацетат, для разделения большинства сахаров [этилацетат — пиридин — вода (8:2:1) и этилацетат — уксусная кислота — вода (3:3:1)], низкая вязкость которых обеспечивает довольно быстрое разделение даже олигосахаридов (для которых, однако, более приемлема система этилацетат — пиридин — вода в соотношении 10:4:3 [397]). Недостатком такого рода систем является их нестабильность, которая связана с заметной склонностью этилацетата к гидролизу. В некоторых случаях преимущество отдается системам, содержащим бутанол-1, как, например, бутанол-1 — пиридин — вода (3:1:1), бутанол-1 — этанол — вода (40:11:19) и бутанол-1 — уксусная кислота — вода (2:1:1) [393]. Последнюю из этих систем часто используют для разделения кислых соединений, ионизация которых подавляется в при-

Таблица 7.6. Хроматография сахаров и полиолов:
некоторые рекомендуемые системы^a

Соединение	$R_{\text{Glc}} \cdot 100$						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
L-Арабиноза	136	200	114	141	175	—	127
D-Ксилоза	178	260	130	159	200	—	136
D-Ликсоза	—	—	—	—	—	—	104
D-Рибоза	214	370	145	186	—	—	80
D-Галактоза	80	85	82	94	80	90	67
D-Глюкоза	100	100	100	100	100	100	100
D-Манноза	143	145	105	119	124	110	94
L-Фукоза	196	—	—	184	225	125	187
L-Рамноза	268	420	159	232	330	—	—
D-Глюкуроновая кислота	4	—	14	98	43	50	—
D-Галактуроновая кислота	11	—	11	90	32	—	—
2-Амино-2-дезоксид-глюкоза	—	—	51	—	—	74	—
2-Амино-2-дезоксид-галактоза	—	—	—	—	—	64	—
2-Ацетамидо-2-дезоксид-глюкоза	—	130	127	—	—	—	—
D-Фруктоза	137	—	118	133	133	—	—
Сахароза	52	—	72	54	28	—	—
Мальтоза	—	—	65	—	—	—	47
Мальтотриоза	—	—	38	—	—	—	—
Раффиноза	—	—	27	—	—	—	—
D-Арабит	—	—	—	—	—	—	49
Рибит	—	—	—	—	—	—	63
Ксилит	—	—	—	—	—	—	13
Дульцит	—	—	—	—	—	—	33
D-Сорбит	—	90	91	—	—	—	13
D-Маннит	—	100	96	—	—	—	33

Хроматографическая бумага, система растворителей: I — ватман № 1, бутанол-1 — пиридин — вода (10:3:3) [383]; II — ватман № 1, этилацетат — пиридин — вода (8:2:1) [383]; III — ватман № 1, этилацетат — пиридин — вода (10:4:3) [383]; IV — ватман № 1, этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода (18:3:1:4) [383]; V — ватман № 1, этилацетат — уксусная кислота — пиридин — вода (10:3:3:2) [399]; VI — ватман № 3, этилацетат — уксусная кислота — пиридин — вода (5:1:5:3) [400]; VII — ватман № 1, импрегнированный вольфрамом при pH 8, ацетон — бутанол-1 — вода (5:3:2) [388].

сутствии уксусной кислоты. Имеют также распространение системы, содержащие муравьиную кислоту. Система этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода (18:3:1:4) обеспечивает удовлетворительное разделение смесей, содержащих наряду с нейтральными моносахаридами D-глюкуроновую и D-галактуроновую кислоты [383]. Для этой цели можно также использовать систему бутанол-1 — бензол — муравьиная кислота — вода (100:19:10:25) (верхний слой) [398]. В системах, со-

державших такие основные компоненты, как, например, пиридин в системе бутанол-1 — пиридин — вода, продвижение кислых сахаров замедляется, на чем может быть основан способ их отделения от нейтральных и аминсахаров; скорость элюирования последних уменьшается в кислых системах растворителей. Показано, что все биологически важные сахара, включая гексуроновые кислоты и аминодезоксигексозы, можно разделить хроматографированием на бумаге в системе этилацетат — уксусная кислота — пиридин — вода при подходящем соотношении уксусной кислоты и пиридина [399, 400]. Для разделения отдельных классов углеводов рекомендуются различные системы растворителей. Так, систему бутанол-1 — этанол — вода в соотношении 4:1:5 (верхний слой) применяют для разделения метилированных сахаров [401] и некоторых полиолов [402], азеотропная смесь бутанон-2 — вода является наиболее эффективной системой для анализа метиловых эфиров сахаров [5], а метилгликозиды можно разделить в системе *трет*-амиловый спирт — изопропанол — вода (8:2:3) [403]. В табл. 7.6 приведены данные об относительной подвижности (R_{Glc}) некоторых сахаров в различных системах.

7.4.2. Тонкослойная хроматография

Первое сообщение об использовании ТСХ для изучения сахаров появилось в 1961 г. [404]. В настоящее время этот метод находит широкое применение для идентификации и разделения углеводов всех типов. ТСХ отличаются более высокой чувствительностью и скоростью разделения, чем при хроматографии на бумаге. Прекрасный обзор наиболее важных работ, посвященных различным аспектам применения ТСХ в области химии углеводов, опубликован в 1976 г. [405]. Практические вопросы качественного и количественного анализа, а также препаративного ТСХ-разделения углеводов подробно рассмотрены в трех статьях Уинга и БеМиллера [406].

В качестве сорбентов для ТСХ наиболее часто применяют целлюлозу, кизельгур и силикагель. Некоторые полимерные носители для гель-хроматографии (сефадекс, или биогель Р), доступные в мелкодисперсном виде (>400 меш), могут быть использованы в тонкослойной гель-хроматографии для быстрого фракционирования таких высокомолекулярных соединений, как гликозаминогликаны [407]. Очевидно, что данный метод представляет собой частный случай СЭХ (разд. 7.2.5) и не будет рассматриваться в этом разделе.

Для ТСХ углеводов находят применение многие системы растворителей. В отличие от хроматографии на бумаге, кото-

рая представляет собой разновидность распределительной хроматографии, механизм разделения при ТСХ меняется в зависимости от природы неподвижной и подвижной фаз. Распределение между этими фазами лежит в основе хроматографии в тонком слое целлюлозы, как и в случае колоночной хроматографии на целлюлозе (разд. 7.2.1) и хроматографии на бумаге. По этой причине эффективными при ТСХ углеводов оказываются тройные системы растворителей, предложенные для хроматографических разделений на бумаге. В ТСХ на силикагеле или кизельгуре существенную роль наряду с процессом распределения играют адсорбционные эффекты. Присутствие неорганических солей в матрице также может оказывать заметное влияние на разделение, что связано с процессами комплексообразования и другими взаимодействиями. Учитывая все это, можно сделать вывод, что выбор оптимальной системы растворителей зависит от используемых условий и полярности изучаемых соединений. Для разделения свободных сахаров обычно применяют водные бинарные или тройные системы различающихся по полярности растворителей. Цитируемый выше обзор [405] содержит перечень хроматографических систем для разного рода разделений. Несмотря на то что подавляющее большинство анализов проводится в одномерном варианте (иногда при использовании многократной или непрерывной хроматографии), в некоторых случаях необходимо применение двумерной ТСХ. Хроматография на пластинках для ВЭТСХ [408], равномерно покрытых слоем микрогранулированного силикагеля (5—10 мкм), более тонким, чем слой силикагеля на пластинках для ТСХ (толщина 250 мкм), позволяет значительно сократить время, а также повысить эффективность и чувствительность разделения.

После хроматографирования пластинку высушивают и опрыскивают обнаруживающим реагентом (разд. 7.4.3). Качественное определение сахаров с помощью ТСХ проводится так же, как и в случае хроматографии на бумаге, и имеет те же ограничения (разд. 7.4.1). Количественный анализ путем денситометрии пятен на пластинках возможен, но сопряжен с некоторыми трудностями [405, 406]. Поэтому предпочтение отдается методу, который включает удаление с пластинки зоны, содержащей исследуемое соединение, с последующим его элюированием и спектрофотометрическим анализом. Как и в случае хроматографии на бумаге, необходимо вводить поправку, учитывающую влияние на результаты анализа попавшего в элюат сорбента. Аналогичная экстракционная процедура применяется в препаративной ТСХ, для которой рекомендуются пластинки с толщиной слоя сорбента около 2 мм [406].

7.4.2.1. ТСХ на целлюлозе

Целлюлоза, используемая в качестве сорбента для ТСХ в форме волокна и в микрокристаллическом виде, имеет те же самые хроматографические характеристики, что и бумага. Для удовлетворительного разделения как моно-, так и олигосахаридов применяют обычно вариант, включающий несколько последовательных разделений. Возможность анализа на пластинках, покрытых слоем волокнистой целлюлозы (Macherey-Nagel MN 300), впервые продемонстрировал Швайгер [409], который провел успешное отделение D-глюкозы, D-галактозы, D-ксилозы, D-маннозы, D-рамнозы, L-рибозы, L-фукозы от 2-амино-2-дезоксид-галактозы в системе этилацетат — пиридин — вода (2:1:2, два пробега). Для разделения гексуроновых кислот была использована система изопропанол — пиридин — уксусная кислота — вода (8:8:1:4). При ТСХ на целлюлозе в системе муравьиная кислота — бутанол-2 — *трет*-бутанол — вода (3:6:8:3) было обнаружено некоторое различие в подвижности D и L-энантиомеров арабинозы [410]. Петрэ и др. [411] использовал эту же систему для разделения смесей сахаров, включая гексуроновые кислоты, из растительных экстрактов. Для удовлетворительного разделения на пластинках, покрытых микрокристаллической целлюлозой (СС 41), потребовалось трехкратное повторение пробега растворителей (общее время 3 ч). Для ТСХ смеси обычных моносахаридов и низших олигосахаридов (до тетрасахарида стахиозы) на целлюлозе (MN 300) была использована та же система растворителей в соотношении 3:5:7:5 в три пробега [412]; в сходных условиях проведен анализ олигосахаридов со степенью полимеризации 2—10, полученных при гидролизе инулина. Среди других систем растворителей, рекомендованных для ТСХ моносахаридов и низших олигосахаридов на целлюлозе, следует отметить системы этилацетат — пиридин — вода (20:7:5) [413] и этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота — пропионовая кислота 10:10:2:1:1 [414].

Спитчен [415] успешно разделил мальтодекстрины (со степенью полимеризации до 5) на пластинках с целлюлозой за один пробег (2 ч) в системе этилацетат — уксусная кислота — пиридин — вода (7:1:5:3). Для разделения олигогалактуроновых кислот, полученных ферментативным гидролизом пектиновой кислоты, использовали продажные пластинки с целлюлозой и хроматографическую систему этилацетат — уксусная кислота — вода (4:2:3, два пробега продолжительностью 150 мин каждый) [106]. Дисахариды, полученные при ферментативном расщеплении хондроитинсульфатов А, В и С, также разделяли на ТСХ-пластинках с целлюлозой в системе бутанол-1 — уксусная

кислота — 1 М водный аммиак (2:3:1), причем для этого потребовалось 6 ч (ср. методы ВЭЖХ [23, 37]).

В большинстве случаев для ТСХ углеводов на пластинках с целлюлозой не требуется дополнительной пропитки сорбента неорганическими солями. Исключение составляет разделение полиолов и отделение их от соответствующих сахаров. Как и в случае хроматографии на бумаге [388], была показана возможность разделения такого рода смесей на пластинках с целлюлозой, обработанных 5%-ным раствором вольфрамата натрия (дигидрат) при рН 6 или 8, в системе бутанол-1 — этанол — вода (40:11:19) и ацетон — бутанол-1 — вода (5:3:2) [417].

7.4.2.2. ТСХ на кизельгуре

Диатомовая земля (кизельгур) является более слабым адсорбентом, чем используемые для ТСХ целлюлоза и силикагель. Эффективное разделение на пластинках с кизельгуром может быть проведено только после пропитки сорбента некоторыми неорганическими солями. ТСХ большинства обычных сахаров на пластинках с кизельгуром G (содержит в качестве связующего гипс), обработанных 0,02 М ацетатом натрия, была выполнена в системе этилацетат — изопропанол — вода (130:47:23). Впоследствии было обнаружено, что L-фукоса не отделяется от пентоз в данных условиях [418]. Однако замена ацетата натрия на однозамещенный фосфат натрия (0,15 М) позволяет значительно повысить эффективность разделения всех сахаров [419]. Для этих разделений рекомендуется система этилацетат — метанол — бутанол-1 — вода (16:3:3:1, два пробега).

Браун с сотр. [153—155] использовал ТСХ на пластинках с кизельгуром, обработанных 0,02 М ацетатом натрия, в системе этилацетат — изопропанол — вода (35:42:23) для разделения олигосахаридов целло-, манно- и ксилодекстринов со степенью полимеризации 6—8. Шеннон и Крич [420] показали, что кизельгур особенно эффективен для ТСХ высших олигосахаридов: мальтодекстрины со степенью полимеризации до 27 были разделены на пластинках с непропитанным кизельгуром G в системах, содержащих бутанол-1, пиридин и воду в различных соотношениях (несколько пробегов). ТСХ фруктанов (степень полимеризации 2—20) из инулина на кизельгуре G была проведена за 90 мин (1 пробег) в системе пропанол-1 — этилацетат — вода (3:1:1) [421].

7.4.2.3. ТСХ на силикагеле

ТСХ на силикагеле или импрегнированном неорганическими солями силикагеле получила чрезвычайно широкое распространение для анализа сахаров и их производных. Разделение на

пластинках с силикагелем носит более отчетливый характер по сравнению с хроматографированием на кизельгуре или целлюлозе. Немодифицированный силикагель служит в основном для ТСХ таких производных углеводов, как метилированные сахара [422—424] и метилгликозиды [422, 423, 425, 426], которые можно разделить в следующих системах растворителей: азеотропная смесь бутанон-2—вода [423], бутанон-2, насыщенный 3%-ным водным аммиаком [424], бензол—этанол—вода—концентрированный аммиак (200 : 47 : 15 : 1, верхний слой) [422] или в случае гликозидов бутанол-1—уксусная кислота—диэтиловый эфир—вода (9 : 6 : 3 : 1) [422], диэтиловый эфир—толуол (2 : 1) [425] или бензол—этанол—вода (170 : 47 : 15, верхний слой) [426]. Показана возможность разделения аномерных метилгликозидов [425, 426], а также различных арилгликозидов в виде полных ацетатов с использованием в последнем случае системы бутанон-2—петролейный эфир (1 : 3) [427]. Тейт и Бишоп [428] провели разделение ацетатов сахаров на пластинках с силикагелем в бензоле, содержащем от 2 до 10% метанола (в зависимости от природы сахара); аналогичные условия использованы для ТСХ гексаацетатов инозитов.

Немодифицированный силикагель обычно не используют для анализа моносахаридов. Однако описано разделение свободных гексоз двумерной ТСХ на силикагеле G в двух различных системах: хлороформ—метанол—вода (16 : 9 : 2) и этилацетат—метанол—уксусная кислота—вода (12 : 3 : 3 : 2) [429], а также с использованием непрерывной ТСХ (7 ч в системе ацетон—вода (15 : 1) [430]). Хансен [431] успешно анализировал обычные моносахариды и олигосахариды со степенью полимеризации 2—5 за один пробег в системе изопропанол—ацетон—1 М молочная кислота (2 : 2 : 1). Показано, что введение в систему растворителей фенилборной или лучше борной кислоты приводит к существенному повышению эффективности разделения смесей сахаров, полученных из биологических жидкостей [432]. В частности, смесь D-глюкуроновой кислоты, D-фруктозы, D-галактозы, D-глюкозы, L-фукозы и 2-дезоксид-рибозы была разделена на пластинках с силикагелем за один пробег в системе бутанон-2—изопропанол—ацетонитрил—0,5 М борная кислота + 0,25 М изопропиламин—уксусная кислота (200 : 150 : 100 : 75 : 2).

Для ТСХ смесей родственных по структуре сахаров пластинки с силикагелем необходимо пропитывать неорганическими солями, способными образовывать комплексы с углеводами. Для этой цели используют борную кислоту [433—435], натрий-ацетатный [436] или фосфатный [436, 437] буферы, а также молибденовую или фосфорновольфрамовую кислоты [438]. Миззетти и др. [439] показал, что двумерная ТСХ в различных системах растворителей на пластинках с модифицированным таким спо-

собом силикагелем обеспечивает разделение смесей всех обычно встречающихся моносахаридов и низших олигосахаридов. Недостатком этого метода является большая длительность анализа (7—8 ч). Впоследствии методика была усовершенствована, что позволило существенно уменьшить время разделения [440]. ТСХ проводили на пластинках с равномерным слоем силикагеля, пропитанного смесью тетрабората и вольфрама натрия в системе этилацетат — изопропанол — вода (2:2:1), а затем, изменив направление хроматографии на перпендикулярное, в системе этилацетат — метанол — уксусная кислота — вода (12:3:3:2). На первом этапе разделение описывается в основном механизмом, включающим комплексообразование, а подвижность сахаров зависит от степени устойчивости их комплекса с борат-ионом, тогда как на второй стадии хроматографии в кислой системе доминирует нормальный процесс распределения. Продолжительность первого пробега составляет 2 ч, а второго — 50 мин; таким образом, общее время анализа, включая 5-минутное высушивание пластинок при температуре 70 °С, не превышает примерно 3 ч.

Другие усовершенствования, направленные на повышение эффективности разделения обычных моносахаридов и небольших олигосахаридов на пластинках с импрегнированным силикагелем, включают программирование состава газовой фазы в хроматографической камере [441] и введение в хроматографические системы молочной кислоты [442]. Хансен [442] показал, что система изопропанол — ацетон — 0,1 М молочная кислота (2:2:1) обеспечивает более высокую степень разрешения на пластинках, пропитанных однозамещенным фосфатом натрия, чем на пластинках с немодифицированным силикагелем [431]. С использованием аналогичным образом пропитанных пластинок и системы изопропанол — ацетон — 0,2 М молочная кислота (6:3:1) Кремер [443] провел разделение нескольких полиолов (от эритрита до гептитов), а также показал возможность анализа некоторых пентитов и гекситов в присутствии соответствующих моносахаридов.

В отличие от нейтральных сахаров аминодезоксисахара чрезвычайно сильно адсорбируются силикагелем, пропитанным боратами или фосфатами, однако их разделение, а также анализ соответствующих N-ацетилированных производных можно провести на пластинках с силикагелем, пропитанных сульфатом меди [444]. В этом случае следует учитывать, что для данного разделения необходимы системы, содержащие водный аммиак, который аминирует нейтральные сахара, препятствуя тем самым проведению одновременного определения нейтральных и аминодезоксисахаров. Таким образом, для исследования гидролизатов гликопротеинов и гликолипидов, которые могут содержать

гексозы, фукозу и производные нейраминовой кислоты наряду с аминодезокси- и ацетамидодезоксисахарами, наиболее рационально использовать ТСХ на немодифицированном силикагеле. Так, например, удовлетворительное разделение наблюдалось для смесей, содержащих 2-амино-2-дезоксид-глюкозу и 2-амино-2-дезоксид-галактозу, их N-ацетильные производные, а также D-глюкозу, D-галактозу и N-ацетилнейраминовую кислоту, на пластинках с силикагелем G в системе пропанол-1—вода (7:1) [445]. Метод Хансена [431] оказался вполне приемлемым для отделения L-фукозы от 2-амино- и 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы и этих моносахаридов от гексоз.

При ТСХ олигосахаридов со степенью полимеризации больше 4 также используют непропитанный силикагель. Ковачевич и Ричардс [446] продемонстрировали возможность разделения ряда изомальтодекстринов и олигосахаридов, имеющих единичные ответвления, присоединенные α -(1 \rightarrow 3)-связями к α -(1 \rightarrow 6)-связанным D-глюканам (степень полимеризации до 9—10), с помощью ТСХ в проточном варианте в системе пропанол-1—нитрометан—вода (5:2:3) за 19 ч при 30°C. Для анализа смеси мальтодекстринов со степенью полимеризации до 16 на пластинках для ВЭТСХ (температура 40—60°C) требуется менее 2 ч (хроматографические системы содержат ацетон, этанол, изопропанол и воду). Очевидно, что в настоящее время хроматография на таких пластинках, которую с успехом использовали для анализа ганглиозидов мозга [448, 449], является наиболее эффективным методом ТСХ-разделения высших олигосахаридов, постепенно вытесняющим более старые методы, включая ТСХ на кизельгуре и целлюлозе. Некоторые системы для ТСХ перечислены в табл. 7.7, которая содержит также данные о значениях R_{Glc} и R_f .

7.4.3. Обнаруживающие реагенты

Для обнаружения углеводов на бумаге или пластинках с тонким слоем используют целый ряд реагентов. Сведения о стандартных реагентах приведены в нескольких книгах и обзорных статьях [381—384, 405, 406, 450]. Недавно опубликован справочник [451], который содержит информацию о приготовлении, реакциях и чувствительности как традиционных, так и более новых обнаруживающих реагентов.

Очевидно, что использование серной кислоты для обнаружения углеводов ограничено ТСХ на неорганических сорбентах. Однако большинство обнаруживающих реагентов может быть использовано как для ТСХ, так и для хроматографии на бумаге. Все они подразделяются на четыре типа в соответствии с механизмом действия.

а) Методы, основанные на использовании восстанавливающей способности сахаров. К неспецифическим реагентам относятся аммиачный раствор нитрата серебра, щелочной перманганат, 3,5-динитросалицилат или 3,4-динитробензоат, а также хлорид трифенилтетразолия. Хальдорсен [452] недавно предложил еще один реагент этого типа — пентоксид ванадия в серной кислоте, с помощью которого можно обнаруживать некоторые различия между отдельными классами углеводов: например, кетозы и альдоновые кислоты проявляются несколько быстрее других сахаров.

б) Методы, включающие реакции сахаров с кислотными компонентами с образованием производных фурфурола, которые при конденсации с фенолами или ароматическими аминами дают окрашенные соединения, часто флуоресцирующие при УФ-облучении. Реагенты этого типа более специфичны, чем перечисленные выше; с углеводами отдельных классов они дают характерную окраску. К такого рода проявителям относятся хорошо известные хлоргидрат *n*-анизидина, фосфат или фталат анилина, а также нафторезорцин (1,3-диоксинафталин) в кислой среде. Преимущество использования анилин-цитратного реагента [453] заключается в возможности дифференциации с его помощью сахаров различных классов. Описана методика, включающая ступенчатое нагревание хроматографической бумаги или пластинки с тонким слоем, опрысканной этим реагентом, поскольку для углеводов, различающихся по структуре и по размеру молекул, характерны разные значения оптимальной температуры и времени нагревания, которые определяют интенсивность окраски и положение максимума флуоресценции [454]. Другим проявителем, позволяющим проводить дифференциацию структурно различающихся сахаров, является дифениламин-анилин-фосфорнокислотный реагент, при обнаружении которым различные моносахариды приобретают широкую гамму оттенков и который окрашивает дисахариды, отличающиеся типом гликозидной связи, в разные цвета [455].

в) Методы, в основе которых лежит расщепление гликолей с последующим обнаружением образующихся фрагментов. Основным реагентом этого типа является метапериодат натрия, после опрыскивания которым хроматограмму проявляют пентадионом-2,4 [456], щелочным перманганатом [457] или аммиачным раствором нитрата серебра [383]. От опрыскивания хроматограмм бензидином для удаления не вступившего в реакцию периодата в последнее время отказываются из-за канцерогенности этого ароматического диамина. Реагенты данного типа не обладают специфичностью.

г) Методы, основанные на использовании реакций, затрагивающих определенные группировки в сахарах. К реагентам,

Таблица 7.7. ТСХ сахаров: некоторые рекомендуемые системы^а

Соединение	Относительная подвижность								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
	R_{Glc}^b	R_{Glc}^B	R_f^B	R_f^r	R_f^r	R_f^r	R_f^r	R_f^A	R_f^e
L-Арабиноза	1,12	1,34	0,61	—	—	0,67	0,47	—	—
D-Ксилоза	1,13	1,54	0,77	—	—	0,76	0,63	0,33	0,46
D-Ликсоза	1,14	1,62	—	—	—	—	0,65	—	—
D-Рибоза	1,16	1,76	0,83	—	—	0,72	0,60	0,20	0,44
D-Галактоза	0,98	0,82	0,28	—	0,54	0,58	0,30	0,29	0,27
D-Глюкоза	1,00	1,00	0,42	0,87	0,62	0,65	0,41	0,38	0,33
D-Манноза	1,04	1,15	—	—	—	0,69	0,50	—	—
L-Фукоза	—	1,62	0,91	—	—	0,75	0,65	0,41	0,42
L-Рамноза	1,22	1,92	0,98	—	—	0,85	0,83	—	—
D-Фруктоза	1,09	1,27	—	—	—	0,64	0,46	0,15	0,30
L-Сорбоза	—	1,29	—	—	—	0,69	0,52	—	—
D-Тагатоза	—	—	—	—	—	—	0,60	—	—
2-Амино-2-дезоксид-D-глюкоза	—	—	—	—	0,21	0,34	—	—	—
2-Амино-2-дезоксид-D-галактоза	—	—	—	—	0,13	—	—	—	—

2-Ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкоза
 2-Ацетамидо-2-дезоксид-D-галактоза
 N-Ацетилнейраминная кислота
 Сахароза
 Мальтоза
 Мальтотриоза
 Мальтотетраоза
 Мальтопентаоза
 Мальтотексаоза

—	—	—	—	0,54	0,79	—	—	—
—	—	—	—	0,45	—	—	—	—
—	—	—	—	—	0,03	—	—	—
0,90	0,60	—	—	—	0,66	0,47	0,38	0,20
0,76	0,48	—	0,77	—	0,57	0,34	0,29	0,18
0,51	0,25	—	0,61	—	0,46	0,27	—	—
—	—	—	0,42	—	0,34	—	—	—
—	—	—	0,24	—	0,27	—	—	—
—	—	—	0,14	—	0,23	—	—	—

^а Покрyтия и системы для хроматографии: I — 0,25 мм целлюлозы MN 300 (Macherey-Nagel), муравьиная кислота — бутанол — трет-бутанол — вода (3 : 5 : 7 : 5) [412]; II — 0,10 мм целлюлозы F (Merck), этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота — пропионовая кислота (10 : 10 : 2 : 1 : 1) [414]; III — 0,5 мм кизельгура G (Merck), импрегнированного 0,15 M NaH₂PO₄, этилацетат — метанол — бутанол-1 — вода (16 : 3 : 3 : 1) [419]; IV — 0,25 мм кизельгура G (Merck), бутан-1-ол — пиридин — вода (13 : 4 : 3) [420]; V — 0,25 мм силикагеля G (Merck), пропанол-1 — вода (7 : 1) [445]; VI — 0,25 мм силикагеля 60 (Merck), пропанол-2 — ацетон — 1 M молочная кислота (2 : 2 : 1) [431]; VII — 0,25 мм силикагеля 60, импрегнированного 0,5 M NaH₂PO₄, пропанол-2 — ацетон — 1 M молочная кислота (2 : 2 : 1) [431]; VIII — 0,30 мм смеси силикагеля G 60 и силорда 63 (2 : 1), импрегнированной 0,032 M тетраборатом натрия и 0,05 M вольфраматом натрия (3 : 1), этилацетат — пропанол-2 — вода (2 : 2 : 1) [440]; IX — 0,30 мм смеси силикагеля G 60 и силорда 63 (2 : 1), импрегнированной 0,032 M тетраборатом натрия и 0,05 M вольфраматом натрия (3 : 1) [440].

- ^б Три пробега.
^в Два пробега.
^г Один пробег.
^д Двумерная хроматография, первое направление.
^е Двумерная хроматография, второе направление, перпендикулярное первому.

специфически проявляющим отдельные классы углеводов, относятся нингидрин и реактив Эльсона — Моргана (пентандион-2,4 с последующим действием *n*-диметиламинобензальдегида) на аминодезоксисахара, оксид ртути(II) с последующей обработкой ацетатом бария для обнаружения полиолов, а также тиобарбитуровая кислота [458] и димедон для проявления кетоз [459].

Различные реагенты довольно значительно отличаются по чувствительности [405, 460]. Часто предпочитают последовательное обнаружение двумя или большим количеством реагентов [405—412].

7.5. Электрофорез

7.5.1. Электрофорез на бумаге

Зонный электрофорез на бумаге может служить в качестве полезного дополнения хроматографии на бумаге при исследовании углеводов и родственных соединений. Для электрофореза незаряженных соединений используют растворы электролитов, которые образуют с углеводами заряженные комплексы, в частности обратные буферы [461], однако электрофорез проводят также в буферах, содержащих другие анионы: арсенит [462], фенолборат [463], германат [464], молибдат [465—467], вольфрамат [467, 468] и станнат [467], которые дают анионные комплексы с полигидроксильными соединениями. Описано также использование в качестве комплексообразующего агента основного тетраацетата свинца [462], который дает катионный комплекс с углеводами. Результаты изучения условий электрофореза изложены в подробных обзорах Фостера [461, 469] и Вайгеля [467], которые также содержат данные о подвижности большого числа соединений, включая альдозы, кетозы, дисахариды и продукты их восстановления, полиолы, циклиты, метилгликозиды и метилированные производные.

Заряженные соединения можно подвергать электрофорезу в отсутствие комплексообразующих агентов, однако Хауг и Ларсен [470] показали, что при анализе гексуриновых кислот эффективность разделения повышается при использовании 0,01 М боратного буфера (рН 9,2), содержащего ионы Ca^{2+} (0,005 М).

Электрофореграммы обычно проявляют теми же реагентами, что и бумажные хроматограммы, если развитию окраски не препятствуют присутствующие в буфере ионы, например борат-ионы. В общем случае при использовании одних и тех же обнаруживающих реагентов чувствительность электрофореза несколько ниже, чем в бумажной хроматографии.

7.5.2. Другие электрофоретические методы

Бурн и др. [471] определяли электрофоретическую подвижность ряда сахаров и полиолов в 0,2 М борате натрия при pH 10, используя не только бумагу, но и стекловолокно. Для соединений со сходной электрофоретической подвижностью на обоих носителях предпочитают использовать стекловолокно, так как в этом случае возможно обнаружение высокочувствительными реагентами, которые из-за своей агрессивности неприемлемы для проявления углеводов на бумаге.

Электрофорез на стекловолочне используют для анализа полисахаридов [472], в частности пектиновых соединений [473]. Однако этот метод имеет ограниченное применение из-за протекающего в процессе разделения интенсивного эндоосмоса. Это препятствие можно устранить силанизацией стекловолочна, что требует введения поверхностно-активных веществ в буфер, использующийся для смачивания полосок из стекловолочна перед электрофорезом, однако более эффективное разделение наблюдается для омыленных образцов пектинов [474].

Электрофорез на мембранах из ацетата целлюлозы с успехом используется для разделения кислых гликозаминогликанов [475, 476] и анализа других кислых полисахаридов, например капсульных полисахаридов бактерий [477], в ацетатных, фосфатных и пиридин-формиатных буферах. Анализ нейтральных полисахаридов можно провести с помощью электрофореза на полосках из ацетата целлюлозы в боратном буфере. Описано, например, разделение различных арабиногалактанов, галактоманнанов и глюканов на ацетате целлюлозы в 0,1 М натрийтетраборатном буфере, содержащем 0,1 М хлорида натрия, pH 9,3 [478]. Для удобства наблюдения полисахариды перед нанесением на электрофореграмму окрашивали, однако в большинстве случаев их обнаруживали после разделения, используя для этого раствор алцианового синего в уксусной кислоте.

Метод окрашивания полисахаридов перед электрофорезом [478] использовали Павленко и Оводов [479] для анализа ряда нейтральных и кислых полисахаридов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Для разделения различных компонентов полидисперсных декстранов и амилопектинов с помощью диск-электрофореза ими использованы буферы, содержащие тетраборат натрия (или борную кислоту), трис(гидроксиметил)-аминометан и натриевую соль EDTA при pH 9,2—9,3. Электрофорез в полиакриламидном геле используют также для анализа пектиновых веществ [480] и сульфатированных полисахаридов из морских водорослей [481], однако основной областью применения данного метода в химии углеводов является исследование гликопротеинов [482] и гликозаминогликанов [483, 484]. В по-

следнем случае рекомендуют использовать 6%-ный полиакриламидный гель и буфер, содержащий 0,1 М Na_3PO_4 , 0,1 М Na_2HPO_4 и 0,125 М формиат натрия, pH 11,5 [483, 484]; полимеры обнаруживают с помощью алцианового синего или толуидинового синего. Недавно были описаны разделение и идентификация кислых гликозаминогликанов в 0,9%-ном агарозном геле в 0,06 М диэтилбарбитуратном или 0,05 М 1,3-диаминопропановом буфере (pH 8,5—8,6) [485]. Показано также, что электрофорез гликопротеинов в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия позволяет анализировать соединения, которые не разделяются другими методами.

Литература

1. Churms S. C. — In: Chromatography. 3rd Edn./Ed. Heftmann E. — New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 637.
2. Whistler R. L., BeMiller J. N. Methods Carbohydr. Chem., 1, 42 (1962).
3. Hough L. Methods Biochem. Anal., 1, 205 (1954).
4. Haulicke J., Samuelson O. Carbohydr. Res., 22, 307 (1972).
5. Boggs L., Cuendet L. S., Ehrental I., Koch R., Smith F. Nature (London), 166, 520 (1950).
6. Merrifield E. H., Stephen A. M. Carbohydr. Res., 74, 241 (1979).
7. Stephen A. M. J. Chem. Soc., 2030 (1962).
8. Dziedzic S., Kearsley M. W. J. Chromatogr., 154, 295 (1978).
9. Parris N. A. Instrumental Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 5. — Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 129.
10. American Society of Brewing Chemists. Amer. Soc. Brew. Chem. J., 35, 104 (1977).
11. Rocca J. L., Rouchouse A. J. Chromatogr., 117, 216 (1976).
12. Churms S. C., Seeman U. A. — In: Handbook of Chromatography Series. Carbohydrates./Ed. Churms S. C. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1982, p. 70.
13. McGinnis G. D., Fang P. J. Chromatogr., 153, 107 (1978).
14. Thiem J., Karl H., Schwentner J., Reimer J. J. Chromatogr., 147, 491 (1978).
15. Thiem J., Schwentner J., Karl H., Sievers A., Reimer J. J. Chromatogr., 155, 107 (1978).
16. Lehrfeld J. J. Chromatogr., 120, 141 (1976).
17. White C. A., Kennedy J. F., Golding B. T. Carbohydr. Res., 76, 1 (1979).
18. Thompson R. M. J. Chromatogr., 166, 201 (1978).
19. Nachtmann F., Budna K. W. J. Chromatogr., 136, 279 (1977).
20. Schwarzenbach R. J. Chromatogr., 140, 304 (1977).
21. Tjaden U. R., Krol J. H., van Hoeven R. P., Oomen-Meulemans E. P. M., Emmelot P. J. Chromatogr., 136, 233 (1977).
22. Bremer E. G., Gross S. K., McCluer R. H. J. Lipid. Res., 20, 1028 (1979).
23. Lee G. J.-L., Evans J. E., Tieckelmann H. J. Chromatogr., 146, 439 (1978).
24. Schwarzenbach R. J. Chromatogr., 117, 206 (1976).
25. Jones A. D., Burns I. W., Sellings S. G., Cox J. A. J. Chromatogr., 144, 169 (1977).
26. D'Amboise M., Noël D., Hanai T. Carbohydr. Res., 79, 1 (1980).
27. Linden L. C., Lawhead C. L. J. Chromatogr., 105, 125 (1975).
28. Conrad E. C., Palmer J. K. Food Technol. Chicago, 30, 84 (1976).
29. Meagher R. B., Furst A. J. Chromatogr., 117, 211 (1976).
30. Gordy V., Baust J. G., Hendrix D. L. Bryologist, 81, 532 (1978).

31. Little J. N., Fallick G. J. J. Chromatogr., **112**, 389 (1975).
32. Rabel F. M., Caputo A. G., Butts E. T. J. Chromatogr., **126**, 731 (1976).
33. Gum E. K., Jr., Brown R. D. Jr. Anal. Biochem., **82**, 372 (1977).
34. Noël D., Hanai T., D'Amboise M. J. Liquid Chromatogr., **2**, 1325 (1979).
35. Zsádon B., Otta K. H., Tüdös F., Szeitli J. J. Chromatogr., **172**, 490 (1979).
36. van Eikeren P., McLaughlin H. Anal. Biochem., **77**, 513 (1977).
37. Lee G. J.-L., Tieckelmann H. Anal. Biochem., **94**, 231 (1979).
38. Aitzetmüller K. J. Chromatogr., **156**, 354 (1978).
39. Wheals B. B., White P. C. J. Chromatogr., **176**, 421 (1979).
40. Wells G. B., Lester R. L. Anal. Biochem., **97**, 184 (1979).
41. Valent B. S., Darvill A. G., McNeil M., Robertsen B. K., Albersheim P. Carbohydr. Res., **79**, 165 (1980).
42. Jones J. K. N., Wall R. A., Pittet A. O. Can. J. Chem., **38**, 2285 (1960).
43. Jones J. K. N., Wall R. A. Can. J. Chem., **38**, 2290 (1960).
44. Saunders R. M. Carbohydr. Res., **7**, 76 (1968).
45. Barker S. A., Hatt B. W., Kennedy J. F., Somers P. J. Carbohydr. Res., **9**, 327 (1969).
46. Jandera P., Churáček J. J. Chromatogr., **98**, 79 (1974).
47. Goulding R. W. J. Chromatogr., **105**, 229 (1975).
48. Angyal S. J., Bethell G. S., Beveridge R. J. Carbohydr. Res., **73**, 9 (1979).
49. Fitt L. E., Hassler W., Just D. E. J. Chromatogr., **187**, 381 (1980).
50. Ladisch M. L., Huebner A. L., Tsao G. T. J. Chromatogr., **147**, 185 (1978).
51. Hokse H. J. Chromatogr., **189**, 98 (1980).
52. Fitt L. E. J. Chromatogr., **152**, 243 (1978).
53. Samuelson O., Swenson B. Acta Chem. Scand., **16**, 2056 (1962).
54. Larsson L.-I., Samuelson O. Acta Chem. Scand., **19**, 1357 (1965).
55. Samuelson O., Strömberg H. Carbohydr. Res., **3**, 89 (1966).
56. Jonsson P., Samuelson O. Anal. Chem., **39**, 1156 (1967).
57. Martinsson E., Samuelson O. J. Chromatogr., **50**, 429 (1970).
58. Samuelson O. — In: Ion Exchange./Ed. Marinsky J. A., Vol. 2. — New York: Dekker, 1969.
59. Samuelson O. Methods Carbohydr. Chem., **6**, 65 (1972).
60. Jonsson P., Samuelson O. J. Chromatogr., **26**, 194 (1967).
61. Larsson L.-I., Ramnäs O., Samuelson O. Anal. Chim. Acta., **34**, 394 (1966).
62. Nackenhorst R., Thorn W. Res. Exp. Med., **172**, 63 (1978).
63. Havlicek J., Samuelson O. Anal. Chem., **47**, 1854 (1975).
64. Havlicek J., Samuelson O. Chromatographia, **7**, 361 (1974).
65. Mopper K., Degens E. T. Anal. Biochem., **45**, 147 (1972).
66. Mopper K., Gindler E. M. Anal. Biochem., **56**, 440 (1973).
67. Mopper K. Anal. Biochem., **85**, 528 (1978).
68. Hobbs J. S., Lawrence J. G. J. Sci. Food Agr., **23**, 45 (1972).
69. Hobbs J. S., Lawrence J. G. J. Chromatogr., **72**, 311 (1972).
70. Khym J. X., Zill L. P. J. Amer. Chem. Soc., **73**, 2399 (1951).
71. Khym J. X., Zill L. P. J. Amer. Chem. Soc., **74**, 2090 (1952).
72. Zill L. P., Khym J. X., Cheniae G. M. J. Amer. Chem. Soc., **75**, 1339 (1953).
73. Kesler R. B. Anal. Chem., **39**, 1416 (1976).
74. Technicon Sugar Chromatography System Brochure. — New York: Ardsley, Technicon, 1968.
75. Floridi A. J. Chromatogr., **59**, 61 (1971).
76. Walborg E. F., Jr., Ray D. B., Öhrberg L. E. Anal. Biochem., **29**, 433 (1969).
77. Walborg E. F., Jr., Kondo L. E. Anal. Biochem., **37**, 320 (1970).
78. Hough L., Jones J. V. S., Wusteman P. Carbohydr. Res., **21**, 9 (1972).
79. Hough L., Sidebotham R. — In: Handbook of Chromatography Series: Carbohydrates./Ed. Churms S. C. — Boca Raton, FL.: CRC Press, 1982, 89.

80. Voelter W., Bauer H. J. *Chromatogr.*, **126**, 693 (1976).
81. Mopper K. *Anal. Biochem.*, **87**, 162 (1978).
82. Chytilová Z., Mikeš O., Farkaš J., Štřop P., Vrátný P. J. *Chromatogr.*, **153**, 37 (1978).
83. Vrátný P., Mikeš O., Farkaš J., Štřop P., Čopíková J., Nejepešská K. J. *Chromatogr.*, **180**, 39 (1979).
84. Spencer N. J. *Chromatogr.*, **30**, 566 (1967).
85. Hough L., Ko A. M. Y., Wusteman P. *Carbohydr. Res.*, **44**, 97 (1975).
86. Sinner M. J. *Chromatogr.*, **121**, 122 (1976).
87. Torii M., Sakakibara K. J. *Chromatogr.*, **96**, 255 (1974).
88. Torii M., Sakakibara K., Misaki A., Sawai T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 459 (1976).
89. Деревицкая В. А., Арбатский Н. П., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, **223**, 1137 (1975).
90. Kochetkov N. K., Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 129 (1976).
91. Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K. *Eur. J. Biochem.*, **86**, 423 (1978).
92. Simatupang M. H. J. *Chromatogr.*, **178**, 588 (1979).
93. Simatupang M. H. J. *Chromatogr.*, **180**, 177 (1979).
94. Khyrn J. X., Doherty D. G. J. *Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3199 (1952).
95. Mopper K. *Anal. Biochem.*, **86**, 597 (1978).
96. Gardell S. *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207 (1953).
97. Donald A. S. R. J. *Chromatogr.*, **134**, 199 (1977).
98. Kennedy J. F., Fox J. E. *Carbohydr. Res.*, **54**, 13 (1977).
99. Sinner M., Puls J. J. *Chromatogr.*, **156**, 197 (1978).
100. Simatupang M. H., Sinner M., Dietrichs H. H. J. *Chromatogr.*, **155**, 446 (1978).
101. Tikhomirov M. M., Khorlin A. Y., Voelter W., Bauer H. J. *Chromatogr.*, **167**, 197 (1978).
102. Aspinall G. O., Molloy J. A., Whitehead C. C. *Carbohydr. Res.*, **12**, 143 (1970).
103. Aspinall G. O., Bhattacharjee A. K. J. *Chem. Soc. C*, 361 (1970).
104. Aspinall G. O., Sanderson G. R. J. *Chem. Soc. C*, 2256 (1970).
105. Duckworth M., Hong K. C., Yaphe W. *Carbohydr. Res.*, **18**, 1 (1971).
106. Liu Y. K., Luh B. S. J. *Chromatogr.*, **151**, 39 (1978).
107. Neukom H., Kuendig W. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 14 (1965).
108. Siddiqui I. R., Wood P. J. *Carbohydr. Res.*, **16**, 452 (1971).
109. Ringertz N. R., Riechard P. *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1467 (1959).
110. Ringertz N. R., Reichard P. *Acta Chem. Scand.*, **14**, 303 (1960).
111. Hallén A. J. *Chromatogr.*, **71**, 83 (1972).
112. Smith D. F., Zopf D. A., Ginsburg V. *Anal. Biochem.*, **85**, 602 (1978).
113. Porath J., Flodin P. *Nature (London)*, **183**, 1657 (1959).
114. Granath K. A., Flodin P. *Makromol. Chem.*, **48**, 160 (1961).
115. Granath K. A. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 20 (1965).
116. Деретман Г. Гель-хроматография. Гель-фильтрация. Гель-проникающая хроматография. Молекулярные сита. — М.: Мир, 1970.
117. Fischer L. — In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 1, Part 2./Eds. Work T. S., Work E. — Amsterdam: North-Holland, 1969.
118. Anderson D. M. W., Dea I. C. M., Hendrie A. *Talanta*, **18**, 365 (1971).
119. Sherma J. — In: *Handbook of Chromatography*, Vol. 2./Eds. Zweig G., Sherma J. — Cleveland, OH: CRC Press, 1972, p. 44.
120. Parris N. A. *Instrumental Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Library Series*, Vol. 5. — Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 191.
121. Churms S. C. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **25**, 13 (1970).
122. Rinaudo M. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2285 (1974).

123. *Anderson D. M. W., Stoddart J. F.* Anal. Chim. Acta, **34**, 401 (1966).
124. *Granath K. A., Kvist B. E. J.* Chromatogr., **28**, 69 (1967).
125. *Arturson G., Granath K.* Clin. Chim. Acta, **37**, 309 (1972).
126. *Nilsson G., Nilsson K. J.* Chromatogr., **101**, 137 (1974).
127. *Grubisic Z., Rempp P., Benoit H. J.* Polym. Sci. Part B, **5**, 753 (1967).
128. *Dintzis F. R., Tobin R. J.* Chromatogr., **88**, 77 (1974).
129. *Pearce R. H., Grimmer B. J. J.* Chromatogr., **150**, 548 (1978).
130. *Hager D. J.* Chromatogr., **187**, 285 (1980).
131. *Chitumbo K., Brown W. J.* Chromatogr., **87**, 17 (1973).
132. *Anderson D. M. W., Stoddart J. F.* Carbohydr. Res., **2**, 104 (1966).
133. *Bombaugh K. J., Dark W. A., King R. N. J.* Polym. Sci. Part C, **21**, 131 (1968).
134. *Chow C. D. J.* Chromatogr., **114**, 486 (1975).
135. *Kennedy J. F. J.* Chromatogr., **69**, 325 (1972).
136. *Wu A. C. M., Bough W. A., Conrad E. C., Alden K. E., Jr.* J. Chromatogr., **128**, 87 (1976).
137. *Basedow A. M., Ebert K. H., Ederer H., Hunger H.* Makromol. Chem., **177**, 1501 (1976).
138. *de Vries A. J., Le Page M., Beau R., Guillemin C. C.* Anal. Chem., **39**, 935 (1967).
139. *Bombaugh K. J., Dark W. A., Little J. N.* Anal. Chem., **41**, 1337 (1969).
140. *Kirkland J. J. J.* Chromatogr., **126**, 231 (1976).
141. *Barker S. A., Hatt B. W., Marsters J. B., Somers P. J.* Carbohydr. Res., **9**, 373 (1969).
142. *Barker S. A., Hatt B. W., Somers P. J.* Carbohydr. Res., **11**, 355 (1969).
143. *Buytenhuys F. A., van der Maeden F. P. B., J.* Chromatogr., **149**, 489 (1978).
144. *Dreher T. W., Hawthorne D. B., Grant B. R. J.* Chromatogr., **174**, 443 (1979).
145. *Knudsen P. J., Eriksen P. B., Fenger M., Florentz K. J.* Chromatogr., **187**, 373 (1980).
146. *Engelhardt H., Mathes D. J.* Chromatogr., **142**, 311 (1977).
147. *Engelhardt H., Mathes D. J.* Chromatogr., **185**, 305 (1979).
148. *Hradil J. J.* Chromatogr., **144**, 63 (1977).
149. *Barker P. E., Hatt B. W., Holding S. R. J.* Chromatogr., **174**, 143 (1979).
150. *McGinnis G. D., Fang P. J.* Chromatogr., **130**, 181 (1977).
151. *Brown W. J.* Chromatogr., **52**, 273 (1970).
152. *Brown W. J.* Chromatogr., **59**, 335 (1971).
153. *Brown W., Andersson O. J.* Chromatogr., **57**, 255 (1971).
154. *Brown W. J.* Chromatogr., **67**, 163 (1972).
155. *Brown W., Chitumbo K. J.* Chromatogr., **66**, 370 (1972).
156. *Dellweg H., John M., Trenel G. J.* Chromatogr., **57**, 89, (1971).
157. *John M., Trenel G., Dellweg H. J.* Chromatogr., **42**, 476, (1969).
158. *Kainuma K., Nogami A., Mercier C. J.* Chromatogr., **121**, 361 (1976).
159. *Sabbagh N. K., Fagerson I. S. J.* Chromatogr., **120**, 55 (1976).
160. *Sabbagh N. K., Fagerson I. S. J.* Chromatogr., **86**, 184 (1973).
161. *Schmidt E., Enevoldsen B. S.* Carbohydr. Res., **61**, 197 (1978).
162. *Wallenfels K., Földi P., Niemann H., Bender H., Linder D.* Carbohydr. Res., **61**, 359 (1978).
163. *Raftery M. A., Rand-Meir T., Dahlquist F. W., Parsons S. M., Borders C. L., Jr., Wolcott R. G., Beranek W., Jr., Jao L.* Anal. Biochem., **30**, 427 (1969).
164. *Capon B., Foster R. L. J.* Chem. Soc. C, 1654 (1970).
165. *Flodin P., Aspberg K.* — In: Biological Structure and Function. Vol. 1./ Eds. Goodwin T. W., Lindberg O. — New York: Academic Press, 1961, p. 345.
166. *Flodin P., Gregory J. D., Rodén L.* Anal. Biochem., **8**, 424 (1964).
167. *Dietrich C. P.* Biochem. J., **108**, 647 (1968).

168. *Hascall V. C., Heinegard D. J.* Biol. Chem., **247**, 4242 (1974).
169. *Maury P.* Biochim. Biophys. Acta, **252**, 48 (1971).
170. *Anderson D. M. W., Dea I. C. M., Munro A. C.* Carbohydr. Res., **9**, 363 (1969).
171. *Churms S. C., Stephen A. M.* Carbohydr. Res., **15**, 11 (1970).
172. *Churms S. C., Stephen A. M.* Carbohydr. Res., **35**, 73 (1974).
173. *Churms S. C., Stephen A. M.* Carbohydr. Res., **45**, 291 (1975).
174. *Brunngraber E. G., Brown B. D.* Biochem. J., **103**, 65 (1967).
175. *Skalka M. J.* Chromatogr., **33**, 456 (1968).
176. *Sumyk G. B., Yocum C. F. J.* Chromatogr., **35**, 101 (1968).
177. *Wasteson A.* Biochem. J., **122**, 477 (1971).
178. *Wasteson A. J.* Chromatogr., **59**, 87 (1971).
179. *Johnson E. A., Mulloy B.* Carbohydr. Res., **51**, 119 (1976).
180. *Hopwood J. J., Robinson H. C.* Biochem. J., **135**, 631 (1973).
181. *Alhadeff J. A.* Biochem. J., **173**, 315 (1978).
182. *Belue G. P., McGinnis G. D. J.* Chromatogr., **97**, 25 (1974).
183. *Hagel L. J.* Chromatogr., **160**, 59 (1978).
184. *Goldstein I. J., Hollerman C. E., Smith E. E.* Biochemistry, **4**, 876 (1965).
185. *Goldstein I. J., Hollerman C. E., Merrick J. M.* Biochim. Biophys. Acta, **97**, 68 (1965).
186. *Lloyd K. O.* Arch. Biochem. Biophys., **137**, 460 (1970).
187. *Aspberg K., Porath J.* Acta Chem. Scand., **24**, 1839 (1970).
188. *Goldstein I. J.* — In: Concanavalin A as a Tool./Eds. Bittiger H., Schnebli H. P. — London: Wiley, 1976, p. 55.
189. Pharmacia Fine Chemicals, Affinity Chromatography: Principles and Methods. — Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1979.
190. *Narasimhan S., Wilson J. R., Martin E., Schachter H.* Can. J. Biochem., **57**, 83 (1979).
191. *Kennedy J. F., Rosevear A. J.* Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2041 (1973).
192. *Goldstein I. J., Hayes C. E.* Advan. Carbohydr. Chem. Biochem., **35**, 127 (1978).
193. *Kristiansen T.* Methods Enzymol., **34**, 331 (1974).
194. *Baldo B. A., Sawyer W. H., Stick R. V., Uhlenbruck G.* Biochem. J., **175**, 467 (1978).
195. *Gleeson P. A., Jermyn M. A., Clarke A. E.* Anal. Biochem., **92**, 41 (1979).
196. *Mintz G., Glaser L.* Anal. Biochem., **97**, 423 (1979).
197. Pharmacia Fine Chemicals. Affinity Chromatography Guide. — Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB, 1979.
198. *Etzler M. E., Kabat E. A.* Biochemistry, **9**, 869 (1970).
199. *Pereira M. E. A., Kabat E. A., Sharon N.* Carbohydr. Res., **37**, 89 (1974).
200. *Irimura T., Kawaguchi T., Terao T., Osawa T.* Carbohydr. Res., **39**, 317 (1975).
201. *Surolia A., Ahmad A., Bachhawat B. K.* Biochim. Biophys. Acta, **371**, 491 (1974).
202. *Surolia A., Ahmad A., Bachhawat B. K.* Biochim. Biophys. Acta, **404**, 83 (1975).
203. *Majumdar T., Surolia A.* Indian J. Biochem. Biophys., **16**, 200 (1979).
204. *Ersson B., Aspberg K., Porath J.* Biochim. Biophys. Acta, **310**, 446 (1973).
205. *Pereira M. E. A., Kabat E. A.* Biochemistry, **13**, 3184 (1974).
206. *Zanetta J.-P., Reeber A., Vincendon G., Gombos G.* Brain Res., **138**, 317 (1977).
207. *Hettinger J., Majors R. E.* Varian Instrument Applications, **10**, 6 (1976).
208. *Binder H. J.* Chromatogr., **189**, 414 (1980).
209. *Liljamaa J. J., Hallén A. A. J.* Chromatogr., **57**, 153 (1971).
210. *Verhaar L. A. T., Dirks J. M. H.* Carbohydr. Res., **62**, 197 (1978).
211. *Katz S., Thacker L. H. J.* Chromatogr., **64**, 247 (1972).

212. Katz S., Pitt W. W., Jr., Mrochek J. E., Dinsmore S. J. *Chromatogr.*, **101**, 193 (1974).
213. Hodge J. E., Hofreiter B. T. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1**, 380 (1962).
214. Morrison W. H., Lou M. F., Hamilton P. B. *Anal. Biochem.*, **71**, 415 (1976).
215. Scott T. A., Jr., Melvin E. H. *Anal. Chem.*, **25**, 1656 (1953).
216. Jenner H. — In: *Proc. European Technicon Symp., Automation in Analytical Chemistry*, Brighton. — New York: Technicon, Ardsley, 1967, p. 203.
217. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
218. Katz S., Dinsmore S. R., Pitt W. W., Jr. *Clin. Chem.*, **17**, 713 (1971).
219. Barker S. A., How M. J., Peplow P. V., Somers P. J. *Anal. Biochem.*, **26**, 219 (1968).
220. White C. A., Kennedy J. F. *Clin. Chim. Acta*, **95**, 369 (1979).
221. Bitter T., Muir H. M. *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
222. von Berlepsch K. *Anal. Biochem.*, **27**, 424 (1969).
223. Dawson R., Mopper K. *Anal. Biochem.*, **84**, 191 (1978).
224. Simatupang M. H., Dietrichs H. H. *Chromatographia*, **11**, 89 (1978).
225. McInnes A. G., Ball D. H., Cooper F. P., Bishop C. T. *J. Chromatogr.*, **1**, 556 (1958).
226. Dutton G. G. S. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **28**, 11 (1973).
227. Dutton G. G. S. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 9 (1974).
228. Björndal H., Hellergquist C. G., Lindberg B., Svensson S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **9**, 610 (1970).
229. Clamp J. R., Bhatti T., Chambers R. E. *Methods Biochem. Anal.*, **19**, 229 (1971).
230. Holligan P. M. *New Phytol.*, **70**, 239 (1971).
231. Holligan P. M., Drew E. A. *New Phytol.*, **70**, 271 (1971).
232. Brobst K. M. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 3 (1972).
233. Sweeley C. C., Tao R. V. P. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 8 (1972).
234. Loewus F., Shaw R. H. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 14 (1972).
235. Sloneker J. H. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 20 (1972).
236. Jones H. G. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 25 (1972).
237. Drawert F., Leupold G. *Chromatographia*, **9**, 447 (1976).
238. Clamp J. R. *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1693 (1977).
239. Freeman B. H., Stephen A. M., van der Bijl P. J. *Chromatogr.*, **73**, 29 (1972).
240. Kennedy J. F., Robertson S. M., Stacey M. *Carbohydr. Res.*, **49**, 243 (1976).
241. Aspinall G. O. *J. Chem. Soc.*, 1976 (1963).
242. Jansson P. E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönnbren J. *Chem. Commun. (Univ. Stockholm)*, No. 8 (1976).
243. Ellis W. C. *J. Chromatogr.*, **41**, 335 (1969).
244. Shaw D. H., Moss G. W. J. *Chromatogr.*, **41**, 350 (1969).
245. Dutton G. G. S., Walker R. H. *Cell. Chem. Technol.*, **6**, 295 (1972).
246. Akhrem A. A., Avvakumov G. V., Strel'chyonok O. A. *J. Chromatogr.*, **176**, 207 (1979).
247. Aue W. A., Hastings C. R., Kapila S. J. *Chromatogr.*, **77**, 299 (1979).
248. Schwarzmann G. O. H., Jeanloz R. W. *Carbohydr. Res.*, **34**, 161 (1974).
249. Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. *Carbohydr. Res.*, **62**, 359 (1978).
250. Gerwig G. J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G. *Carbohydr. Res.*, **62**, 349 (1978).
251. Gerwig G. J., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G. *Carbohydr. Res.*, **77**, 1 (1979).
252. Janauer G. A., Englmaier P. J. *Chromatogr.*, **153**, 539 (1978).
253. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. *Anal. Chem.*, **37**, 1602 (1965).

254. Björndal H., Lindberg B., Svensson S. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1801 (1967).
255. Lönngren L., Pilotti A. *Acta Chem. Scand.*, **25**, 1144 (1971).
256. Morrison I. M. *J. Chromatogr.*, **108**, 361 (1975).
257. Merrifield E. H. — In: *Handbook of Chromatography Series: Carbohydrates*/Ed. Churms S. C. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1982, p. 4.
258. Havercamp J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G. *J. Chromatogr.*, **59**, 281 (1971).
259. Eklund G., Josefsson B., Roos C. *J. Chromatogr.*, **142**, 575 (1977).
260. Cahour A., Hartmann L. *J. Chromatogr.*, **152**, 475 (1978).
261. Choy Y.-M., Dutton G. G. S., Gibney K. B., Kabir S., Whyte J. N. C. *J. Chromatogr.*, **72**, 13 (1972).
262. Dutton G. G. S., Gibney K. B. *J. Chromatogr.*, **72**, 179 (1972).
263. Bebault G. M., Berry J. M., Choy Y.-M., Dutton G. G. S., Funnell N., Hayward L. D., Stephen A. M. *Can. J. Chem.*, **51**, 324 (1973).
264. Sweet D. P., Shapiro R. H., Albersheim P. *Carbohydr. Res.*, **40**, 217 (1975).
265. Bishop C. T., Cooper F. P. *Can. J. Chem.*, **38**, 388 (1960).
266. Kircher H. W. *Anal. Chem.*, **32**, 1103 (1960).
267. Adams G. A., Bishop C. T. *Can. J. Chem.*, **38**, 2380 (1960).
268. Stephen A. M., Kaplan M., Taylor G. L., Leisegang E. C. *Tetrahedron, Suppl.* **7**, 233 (1966).
269. Kaplan M., Stephen A. M. *Tetrahedron*, **23**, 193 (1967).
270. Churms S. C., Merrifield E. H., Stephen A. M. *Carbohydr. Res.*, **81**, 49 (1980).
271. Ovodov Yu. S., Pavlenko A. F. *J. Chromatogr.*, **36**, 531 (1968).
272. Bhattacharjee S. S., Gorin P. A. J. *Can. J. Chem.*, **47**, 1207 (1969).
273. Heyns K., Sperling K. R., Grützmacher H. F. *Carbohydr. Res.*, **9**, 79 (1969).
274. Fournet B., Leroy Y., Montreuil J., Mayer H. J. *Chromatogr.*, **92**, 185 (1974).
275. Anderle D., Petriková M., Kováč P. *J. Chromatogr.*, **58**, 209 (1971).
276. Anderle D., Kováč P., Anderlová H. *J. Chromatogr.*, **64**, 368 (1972).
277. Janeček F., Toman R., Karácsonyi S., Anderle D. *J. Chromatogr.*, **173**, 408 (1979).
278. Anderle D., Kováč P. *J. Chromatogr.*, **91**, 463 (1974).
279. Gunner S. W., Jones J. K. N., Perry M. B. *Chem. Ind. (London)*, **255**, (1961).
280. Gunner S. W., Jones J. K. N., Perry M. B. *Can. J. Chem.*, **39**, 1892 (1961).
281. Metz J., Ebert W., Weicker H. *Clin. Chim. Acta*, **34**, 31 (1971).
282. Schwind H., Schabert F., Schmidt R., Kattermann R. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **16**, 145 (1978).
283. Perry M. B., Webb A. C. *Can. J. Biochem.*, **46**, 1163 (1968).
284. Dutton G. G. S., Kabir S. *Anal. Lett.*, **4**, 95 (1971).
285. Parolis H., McGarvie D. *Carbohydr. Res.*, **62**, 363 (1978).
286. Darvill A. G., Roberts D. P., Hall M. A. *J. Chromatogr.*, **115**, 319 (1975).
287. Talmadge K. W., Keegstra K., Bauer W. D., Albersheim P. *Plant Physiol.*, **51**, 158 (1973).
288. Perry M. B., Webb A. C. *Can. J. Chem.*, **47**, 4091 (1969).
289. Stellner K., Saito H., Hakomori S.-I. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 464 (1973).
290. Sweet D. P., Albersheim P., Shapiro R. H. *Carbohydr. Res.*, **40**, 199 (1975).
291. Ovodov Yu. S., Evtushenko E. V. *J. Chromatogr.*, **31**, 527 (1967).
292. White J. N. C. *J. Chromatogr.*, **87**, 163 (1973).
293. Kärkkäinen J. *Carbohydr. Res.*, **14**, 27 (1970).
294. Mononen I., Finne J., Kärkkäinen J. *Carbohydr. Res.*, **60**, 371 (1978).

295. *Kärkkäinen J.* Carbohydr. Res., **17**, 11 (1971).
296. *Lance D. G., Jones J. K. N.* Can. J. Chem., **45**, 1995 (1967).
297. *Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K.* Carbohydr. Res., **19**, 432 (1971).
298. *Anderle D., Kováč P.* Chem. Zvesti, **30**, 355 (1976).
299. *Seymour F. R., Slodki M. E., Plattner R. D., Jeanes A.* Carbohydr. Res., **53**, 153 (1977).
300. *Seymour F. R., Plattner R. D., Slodki M. E.* Carbohydr. Res., **44**, 181 (1975).
301. *Woolard G. R., Rathbone E. B., Dercksen A. W.* S. Afr. J. Chem., **30**, 169 (1977).
302. *Seymour F. R., Slodki M. E., Plattner R. D., Stodola R. M.* Carbohydr. Res., **48**, 225 (1976).
303. *Seymour F. R., Chen E. C. M., Bishop S. H.* Carbohydr. Res., **73**, 19 (1979).
304. *Baird J. K., Holroyde M. J., Ellwood D. C.* Carbohydr. Res., **27**, 464 (1973).
305. *Varma R., Varma R. S., Wardi A. H. J.* Chromatogr., **77**, 222 (1973).
306. *Varma R., Varma R. S., Allen W. S., Wardi A. H. J.* Chromatogr., **86**, 205 (1973).
307. *Varma R. S., Varma R., Allen W. S., Wardi A. H. J.* Chromatogr., **93**, 221 (1974).
308. *Varma R., Varma R. S. J.* Chromatogr., **128**, 45 (1976).
309. *Varma R., Varma R. S. J.* Chromatogr., **139**, 303 (1977).
310. *Hedgley E. J., Overend W. G.* Chem. Ind. (London), 378 (1960).
311. *Ferrier R. J.* Tetrahedron, **18**, 1149 (1962).
312. *Smith B., Carlsson O.* Acta Chem. Scand., **17**, 455 (1963).
313. *Sweeley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W. J.* Amer. Chem. Soc., **85**, 2497 (1963).
314. *Bethge P. O., Holmström C., Juslin S.* Svensk Papperstidn., **69**, 60 (1966).
315. *Ellis W. C. J.* Chromatogr., **41**, 325 (1969).
316. *Brobst K. M., Lott C. E., Jr.* Cereal Chem., **43**, 35 (1966).
317. *Pierce A. E.* Silylation of Organic Compounds. — Rockford, IL: Pierce Chemical Co., 1968.
318. *Sawardeker J. S., Stoneker J. H.* Anal. Chem., **37**, 945 (1965).
319. *Cheminat A., Brini M.* Bull. Soc. Chim. Fr., **80** (1966).
320. *Laker M. F. J.* Chromatogr., **163**, 9 (1979).
321. *Percival E.* Carbohydr. Res., **4**, 441 (1967).
322. *Bhatti T., Chambers R. E., Clamp J. R.* Biochim. Biophys. Acta, **222**, 339 (1970).
323. *Kärkkäinen J., Vihko R.* Carbohydr. Res., **10**, 113 (1969).
324. *Coduti P. L., Bush C. A.* Anal. Biochem., **78**, 21 (1977).
325. *Raunhardt O., Schmidt H. W. H., Neukom H.* Helv. Chim. Acta, **50**, 1267 (1967).
326. *Perry M. B., Hulyalkar R. K.* Can. J. Biochem., **43**, 573 (1965).
327. *Petersson G.* Carbohydr. Res., **33**, 47 (1974).
328. *Petersson G. J.* Chromatogr. Sci., **15**, 245 (1977).
329. *Yoshida K., Honda N., Iino N., Kato K.* Carbohydr. Res., **10**, 333 (1969).
330. *Reinhold V. N.* Methods Enzymol., **25**, 244 (1972).
331. *Yokota M., Mori T.* Carbohydr. Res., **59**, 289 (1977).
332. *Aluyi H. A. S., Drucker D. B. J.* Chromatogr., **178**, 209 (1979).
333. *Haworth S., Roberts J. G., Sagar B. F.* Carbohydr. Res., **9**, 491 (1969).
334. *Septon H. H. J.* Org. Chem., **29**, 3415 (1964).
335. *Gorin P. A. J., Magus R. J.* Can. J. Chem., **49**, 2583 (1971).
336. *Haverkamp J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G., Veh R. W., Schaur R.* FEBS Lett., **73**, 215 (1977).

337. Dutton G. G. S., Gibney K. B., Jensen G. D., Reid P. E. J. *Chromatogr.*, **36**, 152 (1968).
338. Dutton G. G. S., Gibney K. B. *Carbohydr. Res.*, **25**, 99 (1972).
339. Hughes K. W., Clamp J. R. *Biochim. Biophys. Acta* **264**, 418 (1972).
340. Patel S., Rivlin J., Samuelson T., Stamm O. A., Zollinger H. *Helv. Chim. Acta*, **51**, 169 (1968).
341. Akhrem A. A., Avvakumov G. V., Sidorova I. V., Strel'chyonok O. A. J. *Chromatogr.*, **180**, 69 (1979).
342. Kärkkäinen J. *Carbohydr. Res.*, **11**, 247 (1969).
343. Morrison I. M., Perry M. B. *Can. J. Biochem.*, **44**, 1115 (1966).
344. Laine R. A., Sweeley C. C. *Carbohydr. Res.*, **27**, 199 (1973).
345. Anderle D., Königstein J., Kováčik V. *Anal. Chem.*, **49**, 137 (1977).
346. Adam S., Jennings W. G. J. *Chromatogr.*, **115**, 218 (1975).
347. Toba T., Adachi S. J. *Chromatogr.*, **135**, 411 (1977).
348. Anderle D., Kováč P. J. *Chromatogr.*, **49**, 419 (1970).
349. Sullivan J. E., Schewe L. R. J. *Chromatogr. Sci.*, **15**, 196 (1977).
350. Zanetta J. P., Breckenridge W. C., Vincendon G. J. *Chromatogr.*, **69**, 291 (1972).
351. Vilkas M., Hiu-I-Jan, Boussac G., Bonnard M.-C. *Tetrahedron Lett.*, **1441** (1966).
352. Wrann M. M., Todd C. W. J. *Chromatogr.*, **147**, 309 (1978).
353. Pritchard D. G., Niedermeier W. J. *Chromatogr.*, **153**, 487 (1978).
354. Shapira J. *Nature (London)*, **222**, 792 (1969).
355. Imanari T., Arakawa Y., Tamura Z. *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1967 (1969).
356. Nakamura H., Tamura Z. *Clin. Chim. Acta*, **39**, 367 (1972).
357. Haga H., Imanari T., Tamura Z., Momose A. *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1805 (1972).
358. Eisenberg F. Jr. *Carbohydr. Res.*, **19**, 135 (1971).
359. Eisenberg F., Jr. *Anal. Biochem.*, **60**, 181 (1974).
360. Wood P. J., Siddiqui I. R. *Carbohydr. Res.*, **19**, 283 (1971).
361. Wood P. J., Siddiqui I. R., Weisz J. *Carbohydr. Res.*, **42**, 1 (1975).
362. Morgenlie S. *Carbohydr. Res.*, **41**, 285 (1975).
363. Morgenlie S. *Carbohydr. Res.*, **80**, 215 (1980).
364. Honda S., Takeda K., Kakehi K. *Carbohydr. Res.*, **73**, 135 (1979).
365. Honda S., Yamauchi N., Kakehi K. J. *Chromatogr.*, **169**, 287 (1979).
366. Honda S., Kakehi K., Okada K. J. *Chromatogr.*, **176**, 367 (1979).
367. Kochetkov N. K., Chizhov O. S. *Advan. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39 (1966).
368. Kochetkov N. K., Chizhov O. S. *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 540 (1972).
369. Hanessian S. *Methods Biochem. Anal.*, **19**, 105 (1971).
370. Lönngren J., Svensson S. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **29**, 41 (1974).
371. Björndal H., Lindberg B., Pilotti A., Svensson S. *Carbohydr. Res.*, **15**, 339 (1970).
372. Borén H. B., Garegg P. J., Lindberg B., Svensson S. *Acta Chem. Scand.*, **25**, 3299 (1971).
373. Axberg K., Björndal H., Pilotti A., Svensson S. *Acta Chem. Scand.*, **26**, 1319 (1972).
374. McNeil M., Albersheim P. *Carbohydr. Res.*, **56**, 239 (1977).
375. Partridge S. M. *Nature (London)* **158**, 270 (1946).
376. Hirst E. L., Jones J. K. N. *Disc. Faraday Soc.*, **7**, 268 (1949).
377. Cramer F. *Angew. Chem.*, **62**, 73 (1950).
378. Dedonder R. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 874 (1952).
379. Kowkabany G. N. *Advan. Carbohydr. Chem.*, **9**, 303 (1954).
380. Isherwood F. A. *Brit. Med. Bull.*, **10**, 202 (1954).
381. Lederer E., Lederer M. *Chromatography*. 2nd Edn. — Amsterdam: Elsevier, 1957, p. 245.

382. Block R. J., Durrum E. L., Zweig G. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. 2nd Edn. — New York: Academic Press, 1958, p. 170.
383. Hough L., Jones L. K. N. Methods Carbohydr. Chem., 1, 21 (1962).
384. Percheron F. — In: Chromatography. 2nd Edn./Ed. Heftmann E. — New York: Van Nostrand-Reinhold, 1967, p. 573.
385. Isherwood F. A., Jermyn M. A. Biochem. J., 48, 515 (1951).
386. French D., Wild G. M. J. Amer. Chem. Soc., 75, 2612 (1953).
387. Pressey R., Allen R. S. J. Chromatogr., 16, 248 (1964).
388. Angus H. J. F., Briggs J., Suji N. A., Weigel H. Carbohydr. Res., 66, 25 (1978).
389. Robyt J. F. Carbohydr. Res., 40, 373 (1975).
390. Bandurski R. S., Axelrod B. J. Biol. Chem., 193, 405 (1951).
391. Umeki K., Kainuma K. J. Chromatogr., 150, 242 (1978).
392. Teichmann B. J. Chromatogr., 70, 99 (1972).
393. Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. H. J. Chem. Soc., 1702 (1950).
394. Menzies I. S. J. Chromatogr., 81, 109 (1973).
395. Jermyn M. A., Isherwood F. A. Biochem. J., 44, 402 (1949).
396. Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J. Anal. Chem., 23, 415 (1951).
397. Whistler R. L., Hickson J. L. Anal. Chem., 27, 1514 (1955).
398. Fuleki T., Francis F. J. J. Chromatogr., 26, 404 (1967).
399. Jarvis M. C., Duncan H. J. J. Chromatogr., 92, 454 (1974).
400. Strecker G., Lemaire-Poitau A. J. Chromatogr., 143, 553 (1977).
401. Aspinall G. O., Bhavanandan V. P., Christensen T. B. J. Chem. Soc., 2677 (1965).
402. Bradfield A. E., Flood A. E. Nature (London), 166, 264 (1950).
403. Cifonelli J. A., Smith F. Anal. Chem., 25, 1132 (1954).
404. Stahl E., Kaltenbach U. J. Chromatogr., 5, 351 (1961).
405. Ghebregzabher M., Rufini S., Monaldi B., Lato M. J. Chromatogr., 127, 133 (1976).
406. Wing R. E., BeMiller J. N. Methods Carbohydr. Chem., 6, 42, 54, 60 (1972).
407. Taniguchi N. Clin. Chim. Acta, 30, 801 (1970).
408. Высокоэффективная тонкослойная хроматография./Ред. Златкис А., Кайзер Р. — М.: Мир, 1979.
409. Schweiger A. J. Chromatogr., 9, 374 (1962).
410. Vomhof D. W., Tucker T. C. J. Chromatogr., 17, 300 (1965).
411. Petre R., Dennis R., Jackson B. P., Jethwa K. R. Planta Med., 21, 81 (1972).
412. Damonte A., Lombard A., Tourn M. L., Cassone M. C. J. Chromatogr., 60, 203 (1971).
413. Raudsvold C. W., Klomp H. J. Chromatogr., 57, 99 (1971).
414. Walkley J. W., Tillman J. J. Chromatogr., 132, 172 (1977).
415. Spitschan R. J. Chromatogr., 61, 169 (1971).
416. Wasserman L., Ber A., Allalouf D. J. Chromatogr., 136, 342 (1977).
417. Briggs J., Chambers I. R., Finch P., Slaiding I. R., Weigel H. Carbohydr. Res., 78, 365 (1980).
418. Bell D. J., Talukder M. Q.-K. J. Chromatogr., 49, 469 (1970).
419. Talukder M. Q.-K. J. Chromatogr., 57, 391 (1971).
420. Shannon J. C., Creech R. G. J. Chromatogr., 44, 307 (1969).
421. Collins F. W., Chandorkar K. R. J. Chromatogr., 56, 163 (1971).
422. Hay G. W., Lewis B. A., Smith F. J. Chromatogr., 11, 479 (1963).
423. Williams S. C., Jones J. K. N. Can. J. Chem., 45, 275 (1967).
424. Mied P. A., Lee Y. C. Anal. Biochem., 49, 534 (1972).
425. Gee M. Anal. Chem., 35, 350 (1963).
426. Brennan P. J. J. Chromatogr., 59, 231 (1971).
427. Audichya T. D. J. Chromatogr., 57, 161 (1971).
428. Tate M. E., Bishop C. T. Can. J. Chem., 40, 1043 (1962).

429. Kartnig T., Wegschaider O. J. *Chromatogr.*, **61**, 375 (1971).
430. Bailey D. S. J. *Chromatogr.*, **130**, 431 (1977).
431. Hansen S. A. J. *Chromatogr.*, **105**, 388 (1975).
432. Ghebregzabher M., Rufini S., Sapia G. M., Lato M. J. *Chromatogr.*, **180**, 1 (1979).
433. Pastuska G. Z. *Anal. Chem.*, **179**, 355 (1961).
434. Prey V., Berbalk H., Kausz M. *Mikrochim. Acta*, 968 (1961).
435. Lato M., Brunelli B., Ciuffini G., Mezzetti T. J. *Chromatogr.*, **34**, 26 (1968).
436. Lato M., Brunelli B., Ciuffini G., Mezzetti T. J. *Chromatogr.*, **39**, 407 (1969).
437. Ovodov Yu. S., Evtushenko E. V., Vaskovsky V. E., Ovodova R. G., Solo'eva T. F. J. *Chromatogr.*, **264**, 111 (1967).
438. Mezzetti T., Lato M., Rufini S., Ciuffini G. J. *Chromatogr.*, **63**, 329 (1971).
439. Mezzetti T., Ghebregzabher M., Rufini S., Ciuffini G., Lato M. J. *Chromatogr.*, **74**, 273 (1972).
440. Ghebregzabher M., Rufini S., Ciuffini G., Lato M. J. *Chromatogr.*, **95**, 51 (1974).
441. de Zeeuw R. A., Dull G. G. J. *Chromatogr.*, **110**, 279 (1975).
442. Hansen S. A. J. *Chromatogr.*, **107**, 224 (1975).
443. Kremer B. P. J. *Chromatogr.*, **166**, 335 (1978).
444. Martz M. D., Krivis A. F. *Anal. Chem.*, **43**, 790 (1971).
445. Gal A. E. *Anal. Biochem.*, **24**, 452 (1968).
446. Covacevich M. T., Richards G. N. J. *Chromatogr.*, **129**, 420 (1976).
447. Nurok D., Zlatkis A. J. *Chromatogr.*, **142**, 449 (1977).
448. Zanetta J.-P., Vitiello F., Robert J. J. *Chromatogr.*, **137**, 481 (1977).
449. Ando S., Chang N.-C., Yu R. K. *Anal. Biochem.*, **89**, 437 (1978).
M.: Мир, 1965.
450. Вальди Д. — В кн.: Хроматография в тонких слоях./Ред. Шталь Э. — М.: Мир, 1965.
451. *Handbook of Chromatography Series: Carbohydrates./Ed. Churms S. C.* — Boca Raton, FL: CRC Press, 1982, p. 187.
452. Haldorsen K. M. J. *Chromatogr.*, **134**, 467 (1977).
453. White A. A., Hess W. C. *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 51 (1956).
454. Vitek V., Vitek K. J. *Chromatogr.*, **143**, 65 (1977).
455. Toba T., Adachi S. J. *Chromatogr.*, **154**, 110 (1978).
456. Weiss J. B., Smith I. *Nature (London)*, **215**, 638 (1967).
457. Lemieux R. U., Bauer H. F. *Anal. Chem.*, **26**, 920 (1954).
458. Percheron F. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **44**, 1161 (1962).
459. Adachi S. *Anal. Biochem.*, **9**, 224 (1964).
460. Mes J., Kamm L. J. *Chromatogr.*, **38**, 120 (1968).
461. Foster A. B. *Advan. Carbohydr. Chem.*, **12**, 81 (1957).
462. Frahn J. L., Mills J. A. *Austr. J. Chem.*, **12**, 65 (1959).
463. Garegg P. J., Lindberg B. *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1913 (1961).
464. Lindberg B., Swan B. *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1043 (1960).
465. Bourne E. J., Hutson D. H., Weigel H. J. *Chem. Soc.*, 4252 (1960).
466. Bourne E. J., Hutson D. H., Weigel H. J. *Chem. Soc.*, 35 (1961).
467. Weigel A. *Advan. Carbohydr. Chem.*, **18**, 61 (1963).
468. Angus H. J. F., Bourne E. J., Searle F., Weigel H. *Tetrahedron Lett.*, **55** (1964).
469. Foster A. B. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1**, 51 (1962).
470. Haug A., Larsen B. *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1395 (1961).
471. Bourne E. J., Foster A. B., Grant P. M. J. *Chem. Soc.*, 4311 (1956).
472. Northcote D. H. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 49 (1965).
473. Haaland E. *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2546 (1969).
474. Jarvis M. C., Threlfall D. R., Friend J. *Phytochemistry*, **16**, 849 (1977).
475. Herd J. K. *Anal. Biochem.*, **23**, 117 (1968).

- 476. *Hata R., Nagai Y.* Anal. Biochem., **45**, 462 (1972).
- 477. *Choy Y. M., Dutton G. G. S.* Can. J. Chem., **51**, 198 (1973).
- 478. *Dudman W. F., Bishop C. T.* Can. J. Chem., **46**, 3079 (1968).
- 479. *Pavlenko A. F., Ovodov Yu. S.* J. Chromatogr., **52**, 165 (1970).
- 480. *Do J. Y., Ioannou J., Hard N. F. J.* Food Sci., **36**, 1137 (1971).
- 481. *Bourne E. J., Johnson P. C., Percival E. J.* Chem. Soc. C, 1561 (1970).
- 482. *Clarke J. T.* Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 428 (1964).
- 483. *Hilborn J. C., Anastassiadis P. A.* Anal. Biochem., **31**, 51 (1969).
- 484. *Hilborn J. C., Anastassiadis P. A.* Anal. Biochem., **39**, 88 (1971).
- 485. *Dietrich C. P., McDuffie N. M., Sampaio L. O.* J. Chromatogr., **130**, 299 (1977).
- 486. *Voyles B. A., Moskowitz M.* Biochim. Biophys. Acta, **351**, 178 (1974).

Глава 8

Фармацевтические препараты

Лоуренс Фишбейн

8.1. Введение

В данной главе освещается ряд наиболее поздних и не упоминавшихся ранее достижений в области ГХ, ВЭЖХ и хромато-масс-спектрометрии целого спектра важных классов фармацевтических препаратов с вторичным акцентом на методах ТСХ и определения наркотиков и лекарственных препаратов, применяемых не по назначению. Вполне очевидно, что детальное рассмотрение хроматографических методов, разработанных для анализа многих тысяч лекарственных препаратов, применяемых по назначению и без назначения и относящихся к огромному числу различных классов фармакологической активности, выходит за рамки этого обзора.

По сравнению с другими классами химических веществ (например, промышленными химическими продуктами, пестицидами) изучение фармацевтических препаратов представляет собой область, в которой чрезвычайно широко используется и совершенствуется большое число различных хроматографических методов, в первую очередь ВЭЖХ и хроматомасс-спектрометрия. Хроматография (ГХ, хроматомасс-спектрометрия, ВЭЖХ и ТСХ) находит широкое применение для проверки чистоты, однородности и устойчивости промышленной продукции, в анализе биологических жидкостей и тканей, для установления соответствующей дозировки, путей метаболизма и фармакокинетики, а а также в токсикологии и судебно-медицинской практике.

Принято считать, что за последние десять лет жидкостная хроматография развивалась более быстрыми темпами, чем какой-либо другой метод, причем в большинстве случаев новые методы находили применение прежде всего в области фармацевтики. Это происходит потому, что ВЭЖХ идеально подходит для проверки чистоты и качества лекарственных препаратов, особенно в тех случаях, когда применение ГЖХ затруднено из-за термолабильности или низкой летучести соединения [1]. По этой причине методы ВЭЖХ чаще, чем ГЖХ, используются для контроля качества продукции большинства фармацевтических фирм [2]. Сообщается, что по чувствительности и специфичности

ВЭЖХ во многих случаях не уступает, а порой и превосходит соответствующие методы ГЖХ. Достижения в области разработки колоночных сорбентов, обладающих высокой селективностью, и повышение чувствительности проточных спектрофотометрических, спектрофлуориметрических и электрохимических детекторов должны еще больше способствовать применению ВЭЖХ в анализе лекарственных препаратов [1]. Кроме того, использование автоматических пробоотборников и применение в ВЭЖХ автоматических анализаторов с реакторами в значительной степени способствовали автоматизации жидкостной хроматографии [3—5] и ее более широкому применению в фармакокинетических исследованиях [6].

Повседневное использование ВЭЖХ для идентификации лекарственных препаратов в судебно-медицинских и токсикологических лабораториях в настоящее время намного более ограничено, хотя оно постоянно возрастает [1]. Основными недостатками ВЭЖХ по сравнению с ГЖХ являются: а) более низкая точность определения относительных времен удерживания; б) более затрудненная идентификация пиков в ВЭЖХ; в) меньшее количество литературных данных о применении ВЭЖХ в анализе, например наркотиков, амфетаминов, барбитуратов и транквилизаторов [2]. ВЭЖХ до сих пор в незначительной степени применялась в крупномасштабном скрининге образцов мочи в программах по контролю за употреблением наркотиков из-за недостаточной скорости и чувствительности анализа [7].

Жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией является одним из наиболее многообещающих аналитических методов, разработанных за последние 10 лет [8]. Этот метод представляется интересным по крайней мере по двум причинам. Во-первых, он может компенсировать недостаток гибкости и универсальности традиционных детекторов для жидкостной хроматографии и, во-вторых, дополнить весьма важные функции хроматомасс-спектрометрии в органическом анализе [8, 9]. Однако проблемы, связанные с разработкой надежных и удобных комплексов ВЭЖХ с масс-спектрометром, во много раз сложнее, чем для ГХ-масс-спектрометрических систем. Это обусловлено тем, что все до сих пор разработанные переходные устройства изменяют нормальный режим работы жидкостного хроматографа или масс-спектрометра или одновременно обоих [8]. Тем не менее за последние десять лет были сделаны определенные успехи в усовершенствовании этих систем с технической и методической точек зрения [10, 11], а также в их применении при анализе лекарственных препаратов [12—14]. Существуют прямые указания на то, что ВЭЖХ-масс-спектрометрию «нельзя рассматривать как объект преходящего интереса — она скорее представляет собой новый и важный аналитический метод» [8].

В большинстве лабораторий газовая хроматография была и остается лучшим методом разделения термостабильных и летучих органических и неорганических соединений. Широкое использование этого метода обусловлено в первую очередь его непревзойденными разрешающей способностью, скоростью, точностью, эффективностью, легкостью получения количественных данных, наличием специфических и универсальных детекторов и возможностью сопряжения газового хроматографа с масс-спектрометром — мощным инструментом идентификации компонентов [5]. Однако ГЖХ не всегда пригодна для анализа высокополярных соединений из-за их нелетучести или термолабильности. По этим, а также по другим причинам ВЭЖХ находит возрастающее применение.

Хроматомасс-спектрометрия является, по-видимому, наиболее эффективным и полезным методом идентификации органических соединений в следовых количествах, и в настоящее время она становится стандартным методом анализа целого ряда фармацевтических препаратов различных классов. Хотя метод хроматомасс-спектрометрии был разработан в 1959 г. [16, 17], он не получил заметного распространения в токсикологических исследованиях вплоть до семидесятых годов [16, 18]. Среди доступных в настоящее время методов обнаружения наркотиков в биологических образцах хроматомасс-спектрометрический анализ должен рассматриваться по всем параметрам как метод, обладающий наивысшей специфичностью [19—22]. В этом методе достоверность идентификации приближается к 100% [16]. Несмотря на то что описан целый ряд скрининговых хроматомасс-спектрометрических методик [20—25] и сам метод приобретает все большее значение в судебной и клинической токсикологии, его применимость в массовом скрининге образцов мочи при контроле дозировки лекарственных препаратов остается под вопросом из-за высокой стоимости оборудования и технических трудностей [7].

ТСХ принято рассматривать в качестве недорогого метода с умеренной специфичностью и емкостью в отношении количества образцов и компонентов смеси, но требующего предварительной экстракционной обработки образцов, обладающего ограниченной чувствительностью и создающего некоторые трудности при количественных измерениях. Тем не менее он широко известен как ценный метод разделения и скрининга лекарственных препаратов в первую очередь в образцах мочи и при токсикологических анализах благодаря низкой стоимости, простоте операций и хроматографического оборудования и селективности обнаруживающих реагентов. С другой стороны, ТСХ страдает недостатком чувствительности и селективности и часто отсутствием объективных критериев оценки разрешающей способности [26].

Поскольку высокоэффективная ТСХ превосходит обычную по скорости и чувствительности и позволяет проводить анализ большего числа образцов при меньших затратах растворителей, этот метод становится все более популярным. Имеющиеся в настоящее время в продаже хроматографические пластинки с привитыми химическим путем неполярными фазами позволяют анализировать множество соединений, хроматография которых на пластинках с силикагелем была до этого невозможной. Примеры разделения на тонкослойных пластинках в обращенных фазах приведены в недавно опубликованных обзорах Бринкмана и Де Врие [27, 28], а свойства пластинок и условия проведения анализа были описаны Сиоуффи и др. [29] и Кайзером и Ридером [30].

8.2. Газовая хроматография

В целом ряде недавних обзоров обсуждалось применение газовой хроматографии для определения чистоты лекарственных препаратов и их содержания в биологических жидкостях [31—36], для анализа фармацевтических препаратов в целом [36, 37], а также в исследованиях образцов мочи с целью предотвращения употребления наркотиков и при контроле курсов лечения с одновременным применением нескольких препаратов [7]. Кроме того, необходимо упомянуть пятитомную серию, посвященную анализу лекарственных веществ и их метаболитов (включая применение хроматомасс-спектрометрии) под редакцией Б. Гудзинович и М. Гудзинович [38—42], двухтомную работу о распределении токсических лекарственных веществ и химикатов в организме человека [43, 44], а также короткую монографию Бермана [45], посвященную проблемам анализа наркотиков.

8.2.1. Антikonвульсанты

В последнее время во многих клинических лабораториях становится обычным контроль за концентрацией антikonвульсантов в крови больных, постоянно получающих эти препараты. Этот контроль помогает, например, при лечении эпилепсии, так как позволяет поддерживать уровень антikonвульсантов в крови в пределах между терапевтической и токсической концентрациями. Общеизвестно, что обязательно следует принимать во внимание индивидуальные различия в скоростях всасывания, выведения через почки и метаболизма лекарственного вещества, а также возможную невосприимчивость больного к действию лекарственных средств [46]. ГЖХ является одним из лучших современных методов контроля за антikonвульсантами благода-

ря чувствительности, специфичности и возможности одновременного анализа нескольких препаратов. Описывается несколько методов, большинство из которых предназначено для одновременного определения примидона (5-этилдигидро-5-фенил-4,6-(1Н,5Н)-пиримидиндиона), фенобарбитала (фенилэтилмалонилмочевины), дифенилгидантоина (5,5-дифенилимидазолидин-2,4-диона), этосукцимида (2-этил-2-метилсукцинимид) и карбамазепина (5-карбамоил-5Н-добенз[*b, f*]азепина) [46—61].

В ГЖХ чаще всего используют насадочные колонки, а в качестве необходимой меры для улучшения формы пиков и предотвращения необратимой сорбции на неподвижной фазе антиконвульсанты превращают в производные [62]. Хилл и Латам [57] описали количественный метод определения этосукцимида, фенобарбитона, примидона и дифенилгидантоина в крови ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), включающий прямую экстракцию 1 мл сыворотки. Этосукцимид анализировали в нативной форме на сорбенте, содержащем 4% OV-225 на твердом носителе в изотермических условиях. Одновременный анализ остальных трех антиконвульсантов в виде производных, полученных мгновенным алкилированием гидроксидом триметиланилина, проводили на колонке с 3% OV-17 в градиентном температурном режиме. В качестве быстрого и простого метода чаще всего используют мгновенное алкилирование «вне колонки» [63]. Этот метод приводит к полному метилированию барбитуратов и гидантоинов, причем в каждом случае образуется единственный продукт, устойчивый в нейтральной среде при комнатной температуре не менее 24 ч [57]. Годолфин и Тома [60] сообщили о применении нового материала SP-2510DA (Supelco) в качестве насадки для колонок. Этот материал пригоден для определения широкого круга антиконвульсантов методом ГЖХ с ПИД без получения производных. Простой прием — добавление еще одной короткой «предколонки», наполненной SP-2250DA, устраняет помехи, создаваемые сывороточным холестерин, при определении примидона.

Хотя в анализе антиконвульсантов с помощью ГЖХ в основном применяется ПИД, также сообщалось о применении с этой целью термоионного детектора с щелочным металлом (ТИД). Сенгупта и Пит [59] описывают разделение семи антиконвульсантов (этосукцимида, фентурида, этотина, фенобарбитона, карбамазепина, примидона, фенитоина) на сорбенте, содержащем 1% OV-17 на твердом носителе, с обнаружением ТИД и одновременный анализ валпроата натрия на 2% SP-1000 с помощью ПИД. Специфичность ТИД позволяет значительно сократить время экстракции, поскольку отпадает необходимость удаления таких нейтральных мешающих компонентов, как холестерин. Еще одним преимуществом ТИД является повышенная

чувствительность к азотсодержащим соединениям, что позволяет снизить пределы обнаружения по сравнению с обычным ПИД и, следовательно, уменьшить размер образца. Поскольку валпроат натрия не содержит азота, для его определения использовали обычный ПИД.

Дриссен и Эмондс [64] предложили использовать для анализа целого ряда антиконвульсантов в нативной форме насадочные микроколонки со смешанной неподвижной фазой (OV-225 и OV-17). Однако в качестве их недостатков Крамерс и др. [46] отмечали сравнительно большую площадь носителя и небольшой срок службы таких колонок. Они описали метод количественного определения немодифицированных антиконвульсантов, например фенобарбитала, цигептамида, карбамазепина, примидона и фенитоина, с помощью ГЖХ высокого разрешения на открытых капиллярных колонках с пористым слоем. Силикатный сорбент (Cab-O-Sil) дезактивировали хлоридом бензилтрифенилфосфония, наносили на внутреннюю поверхность стеклянной капиллярной колонки размером 15 м × 0,4 мм (внутр. диаметр), а затем покрывали полярной неподвижной фазой (OV-225). Эта колонка характеризовалась высокой эффективностью и стабильностью качества разделения. Воспроизводимость анализа была лучше чем 1,2%, а предел обнаружения составлял порядка 10^{-10} г.

Для лечения некоторых форм эпилепсии в последнее время широкое применение получила валпроевая кислота (ди-*n*-пропилацетат), что стимулировало интерес к разработке методов ее определения [65]. Степень связывания этой кислоты с белком может играть определенную роль при оценке концентрации препарата в плазме отдельных больных. Иногда концентрация валпроевой кислоты может оказаться неожиданно низкой, особенно в образцах слюны или спинномозговой жидкости. Йенсен и Гуглер [65] сообщили об использовании ГЖХ для определения валпроевой кислоты в плазме, слюне, спинномозговой жидкости и в моче с чувствительностью до 1 мкг и менее. Метод Йенсена и Гуглера основан на использовании силианизированной колонки, заполненной неподвижной фазой, предназначенной для определения свободных жирных кислот (FFAP, Applied Science) и ПИД. Все остальные известные методы имеют предел обнаружения порядка 5 мкг на 1 мл плазмы [66—68].

8.2.2. 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 синте-

зированных до сих пор 2500 барбитуратов более 50 в настоящее время поставляются на мировой рынок для клинического применения [69]. 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. Злоупотребление лекарственными препаратами, в том числе и барбитуратами, распространено достаточно широко, а международный характер подпольной торговли означает, что любая судебно-медицинская лаборатория в своей работе может неожиданно столкнуться с широким спектром этих соединений. Кроме того, в случаях злоупотребления барбитуратами они часто встречаются в смеси друг с другом, другими лекарственными веществами и (или) антидотами, т. е. возникает сложная аналитическая задача по выделению и идентификации специфических барбитуратов.

ГЖХ с ПИД на насадочных колонках широко употребляется для одновременного анализа барбитуратов в биологических жидкостях. Некоторые хроматографисты анализируют необработанные лекарственные препараты [47, 64, 70—73], в то время как другие перед анализом получают производные путем замещения кислого протона молекулы с целью уменьшения полярности и, следовательно, адсорбции на носителе и размывания пиков. Нашли применение некоторые производные, включая N-триметилсилильные [74—76] и N-пентафторбензильные [77] производные и наиболее распространенные N-1,3-диметильные аддукты. Метилирование диазометаном или диметилсульфатом перед ГХ-анализом [78—82] увеличивает число стадий, тогда как метилирование в колонке и мгновенное метилирование гидроксидом тетраметиламмония [49, 83—87] или триметиланилина [48, 50, 56, 88, 89] проще и поэтому применяется все чаще. Однако до последнего времени производные барбитуратов чаще всего получают действием гидроксида тетраметиламмония «в колонке», несмотря на наблюдаемое в щелочной среде разложение продуктов [90—92].

Одновременное определение диметилированных барбитуратов и других антиконвульсантов методом ГХ с ПИД после твердофазного мгновенного метилирования в инжекторе описано в работе [86]. Открытую капиллярную колонку с закрепленным пористым слоем (SCOT) длиной 2 м, на стенки которой нанесен хромосорб R-6470-1 (Supelco), покрытый SE-30, готовили в соответствии с методами, изложенными в работах [93] и [94] и предназначенными для разделения двенадцати барбитуратов и других антиконвульсантов в виде продуктов метилирования гидроксидом тетраметиламмония. Предел обнаружения (0,1 мкг/

/мл) и точность ($\pm 5\%$) вполне приемлемы для рутинного определения барбитуратов на терапевтическом уровне, а специфичность обеспечивается высокой разрешающей способностью хроматографической колонки. Авторы полагают, что специфичность данного метода в целом делает его конкурентоспособным и по крайней мере позволяет сравнивать по эффективности с другими методами, используемыми в настоящее время, которые или дороже (например, хроматомасс-спектрометрия, азотспецифичные детекторы) или сложнее (например, смешивание газа-носителя с парами муравьиной кислоты). Метод твердофазного мгновенного метилирования в инжекторе в значительной степени уменьшает «хвостовые» эффекты растворителей и предотвращает перегрузку колонки. Такой способ ввода по воспроизводимости эквивалентен обычной системе с прокладкой и при необходимых мерах предосторожности мало влияет ($< 10\%$) на выход производных [86].

Ву и Пирсон [87] описали использование капиллярной колонки из нержавеющей стали длиной 15,2 м с OV-17 (степень покрытия 5%) и двух метилирующих агентов — гидроксида тетраметиламмония и метилиодида в присутствии K_2CO_3 , применяемого в качестве конденсирующего агента, для качественного анализа десяти барбитуратов. Метод обеспечивает высокую разрешающую способность и чувствительность определения, так что идентификация индивидуальных барбитуратов легко осуществима. Все же, несмотря на высокую механическую прочность, металлическая капиллярная колонка обладает рядом недостатков: каталитической активностью и тенденцией к сорбции компонентов образца. Поэтому при анализе пикограммовых количеств этих лекарственных препаратов следовало бы признать логически более правильным выбор стеклянных капиллярных колонок [87].

Хотя ГЖХ-анализ барбитуратов был основан почти исключительно на использовании ПИД, в настоящее время известно, что ПИД не является специфичным. Это ограничивает его применение в определении следовых количеств барбитуратов в таких сложных биологических смесях, как сыворотка и моча. Кроме того, необходима предварительная очистка для удаления мешающих примесей, поскольку ПИД реагирует на присутствие любого органического соединения. Недостаточная специфичность может приводить к получению неоднозначных результатов, нуждающихся в дополнительном подтверждении. Холл и Риск [95] описали быстрый и специфичный метод анализа свободных барбитуратов в сыворотке крови и моче на любом клиническом уровне, основанный на использовании газового хроматографа и сконструированного Холлом детектора по электропроводности. Этот метод пригоден для определения барбитуратов в количе-

стве 10 мкг/мл без предварительной очистки образца. Колонка с 3% OV-17 (или SP-2250) на хромосорбе 750 (размер частиц 100—200 меш), дезактивированном 0,2%-ной фосфорной кислотой, обеспечивает лучшую общую эффективность. Она обладает отличной устойчивостью: на ней можно проводить около 250 анализов с прямым вводом экстрактов образцов.

Сан и Хоффман [96] описали чувствительный метод ГЖХ-анализа целого ряда барбитуратов, который включает стадии предварительной экстракции из сыворотки, получения метилированных производных путем обработки образцов метилиодидом в соответствии с модифицированным методом, описанным в работе [97], и количественное определение с помощью ГЖХ в режиме азотспецифичного детектирования (с азот-фосфорным ПИД—ТИД). Предел обнаружения фенобарбитала составляет 0,08 мкг/мл, для анализа требуется всего 0,1 мл сыворотки. Барбитураты разделяли на колонке длиной 1,2 м с 2% OV-101. Элахи [98] сообщил недавно о новом методе экстракции инкапсулированным активным углем перед определением барбитуратов в образцах крови. Лекарственные препараты адсорбировали непосредственно из крови на предварительно отмеренном количестве активного угля, помещенного в капсулу из пористого полипропилена диаметром 1 см. Адсорбированные вещества экстрагировали эфиром и анализировали на колонке с неподвижной фазой 3% SP-2250 на твердом носителе и с ПИД. Получена линейная зависимость величины сигнала детектора от количества вещества в пределах от 2,5 до 30 мкг/мл крови для бутамо-, пенто- и секобарбитала и от 5 до 60 мкг/мл для фенобарбитала. Нижний предел обнаружения составлял 0,05 мкг/мл (в случае фенобарбитала 0,1 мкг/мл). Экстракты как свежей, так и трупной крови обладали весьма низким фоном в указанных пределах, а общее время анализа составляло всего 10 мин.

8.2.3. Трициклические антидепрессанты

Трициклические антидепрессанты в настоящее время принадлежат к числу лекарственных препаратов, наиболее часто назначаемых при психических расстройствах и при лечении депрессий. Рутинный контроль содержания этих веществ в плазме больных предоставляет полезную клиническую информацию, поскольку у больных, постоянно получающих такие препараты, их уровень в плазме может снизиться до 10—20 нг/мл, тогда как при передозировках он может достигать нескольких миллиграммов в литре [99]. Многочисленные методики аналитического рутинного измерения терапевтических концентраций этих широко используемых лекарственных препаратов в сыворотке и плазме крови рассмотрены в обзорах [100, 101]. Наиболее часто для

измерений применяют ГЖХ с азотспецифичными детекторами [100—120], ПИД [116, 121—125] или детекторами электронного захвата (ДЭЗ) [126—128].

Большинство ГХ-методов, описанных в последние годы, касаются определения наиболее популярного антидепрессанта амитриптилена и его деметилированного метаболита нортриптилина [100, 102, 104, 110, 114, 121, 122, 124, 126]. В наиболее ранних ГХ-методах применялись ПИД [99, 121, 122, 125], которые относительно малочувствительны и требуют больших количеств образца плазмы (например, 5—10 мл). Хотя с применением ДЭЗ чувствительность определения значительно возросла и появились достоверные методы определения нортриптилина [127, 128], основным препятствием к их использованию явилась чрезмерная длительность стадии приготовления фторированных производных [111]. К тому же, поскольку антидепрессанты, содержащие четвертичную аммониевую группировку, не могут быть модифицированы без предварительного деметилирования, ДЭЗ довольно ограниченно применяются в повседневной практике. При серийных анализах трициклических антидепрессантов в клинических лабораториях наибольшее практическое применение находит ГЖХ с азотспецифичными ТИД [100, 102, 111]. Однако некоторые из описанных методик с «азотспецифичными» детекторами неудобны в серийном анализе, так как они требуют получения производных [109, 110], специальной предварительной обработки стеклянной посуды [105, 109, 110], двойной экстракции [107, 111, 112] или большого количества образца (более 4 мл для трахкратного анализа) [105, 110]. Кроме того, по-видимому, потребуется проведение достаточно большого числа анализов трициклических антидепрессантов, чтобы оправдать приобретение азотспецифичного детектора, который в настоящее время не является обычным в большинстве лабораторий [129].

При определении трициклических антидепрессантов методом ГЖХ наиболее распространенной неподвижной фазой является OV-17 (3%). Она обладает достаточно высокой селективностью и пригодна для разделения большинства представителей лекарственных препаратов этого класса [100]. Вместе с тем относительные коэффициенты удерживания многих из этих лекарственных веществ имеют весьма близкие значения [130], что затрудняет количественное определение в случае одновременного применения нескольких препаратов [100]. В работе [114] описан ГЖХ-анализ трициклических антидепрессантов с азотспецифичным детектором на традиционной насадочной (3% OV-17 на SP-2250) или капиллярной колонке (SE-30). Путем простой экстракции гексаном предварительно подщелоченной плазмы с последующей обработкой гептафтормасляным ангидридом авторы достоверно определяли терапевтические концентрации (вплоть

до 5 нг/мл) исходных лекарственных веществ и их деметилированных метаболитов. Было найдено, что для таких рутинных целей, как контроль уровня препарата в плазме во время ежедневного приема трициклических антидепрессантов, больше подходит насадочная колонка. Она проще в работе и дешевле, а наличие двойного газового хроматографа позволяет использовать одновременно две колонки, что невозможно в случае капиллярных колонок и системы непрерывного ввода. С другой стороны, на капиллярной колонке получали более высокое разрешение газохроматографических пиков, что свидетельствует о преимуществах колонок такого типа при определении очень низких концентраций антидепрессантов в плазме или в присутствии других применяемых одновременно лекарственных препаратов или веществ эндогенного происхождения, мешающих определению. Кроме того, капиллярные колонки обладают, по-видимому, особенно заметными преимуществами при изучении фармакокинетики [114].

Недавно сообщалось о применении быстрой изотермической ГЖХ с азот-фосфорспецифичным детектором для количественного определения трициклических антидепрессантов в сыворотке [120]. Этот метод пригоден для количественного определения амитриптилина, нортриптилина, имипрамина, дезметилимипрамина, доксемина, дезметилдоксемина, кломипрамин, дезметилкломипрамина, тримипрамина, дезметилтримипрамина и дибензепина. Он не требует получения производных метаболитов и включает однократную экстракцию раствором гексана в изопропанол и изотермическую хроматографию на OV-25. Зависимость сигнала детектора от концентрации определяемого вещества линейна в диапазоне от 10 до 1500 мкг/л, коэффициент вариации не превышает 7,7%, продолжительность определения различных трициклических антидепрессантов 5—100 мин.

8.2.4. Бензодиазепины

С момента открытия в 1957 г. хлордиазепоксида, известного в медицине под названием Librium, бензодиазепины оказали огромное влияние на лечение расстройств нервной системы; в настоящее время они являются самым распространенным классом лекарственных препаратов с антианксиолитическим действием и, кроме того, наиболее широко назначаются в США [131]. Большую озабоченность вызывает их способность вырабатывать физическую и психическую зависимость [132]. Имеется широкий спектр методов анализа бензодиазепинов, их метаболитов или продуктов кислотного гидролиза, например бензофенонов, при терапевтическом мониторинге, фармакокинетических исследова-

ниях или поисковых тестах. Обзор работ по анализу бензодиазепинов вплоть до 1974 г. составлен Клиффордом и Смитом [133] и Хэйли [134].

Поскольку концентрация лекарственного вещества во время лечения бензодиазепинами (например, диазепама) обычно составляет менее 1 мг/л, для одновременного определения исходного препарата и его метаболитов в биологических жидкостях требуются методы, обладающие высокой чувствительностью [133, 134]. В клинической практике, например, однократная доза диазепама для перорального употребления обычно лежит в пределах от 2 до 10 мг и назначается 2—4 раза в день. Пиковые концентрации диазепама у человека при ежедневном трехразовом приеме по 5 мг препарата составляют 221—400 нг/мл в плазме [135], или 137—189 нг/мл в цельной крови [136]. Это соответствует равновесной концентрации в плазме на уровне 230—440 нг/мл [137], в то время как при ежедневном одноразовом пероральном приеме по 10 мг диазепама его концентрация в крови составляет ~200 нг/мл [136]. Концентрация основного N-деметилированного метаболита диазепама, нордиазепама, в крови составляет от 10 до 20 нг/мл при пиковой концентрации диазепама после одноразовой дозы препарата в 10 мг, равновесная концентрация может достигать 100—150 нг/мл при постоянном употреблении по 10 мг диазепама 1 раз в день [136, 138].

Диазепам и его производные определяли в биологических жидкостях прежде всего методом ГЖХ с азотспецифичным детектором [139, 140], ПИД [141] и ДЭЗ [133, 134, 137—156]. Поскольку адсорбция на колонке (особенно нанограммовых количеств N-дезалкильных производных) представляет при разделении определенные трудности, в более ранних методиках рекомендовали превращать диазепам и дезметилдиазепам в соответствующие производные О-аминобензофенона путем кислотного гидролиза, который предварял ГЖХ-анализ с ДЭЗ [133, 134, 141, 153, 154]. Методы, включающие кислотный гидролиз бензодиазепинов до производных бензофенона, требуют больших затрат времени на предварительную очистку образца. Кроме того, они недостаточно специфичны, поскольку метаболиты исходных лекарственных веществ, при их наличии в достаточном количестве, также образуют производные бензофенона [133, 134]. Некоторые из более поздних методов не требуют предварительной модификации диазепама и его метаболитов; эти методы ГЖХ-анализа основаны на применении OV-17 и ^{63}Ni -ДЭЗ [137, 145—149].

Диазепам и дезметилдиазепам в виде производных определяли в цельной крови с использованием азот-фосфорспецифичного детектора [139]. Проблема количественного определения

дезметилдиазепама, которому на некоторых жидких фазах, например OV-1, присущи «хвостовые» эффекты, была разрешена путем его превращения в соответствующее N-пропильное производное. Сигнал азот-фосфорспецифичного детектора для этого производного был в 1,2 раза больше, чем для диазепама. Нижний предел обнаружения диазепама и дезметилдиазепама составляет 10 нг/мл. Вейнфельд и др. [138] описали быстрый метод определения этих соединений в плазме человека. Лекарственные вещества экстрагировали бензолом (1,0 мл бензола на 0,5 мл плазмы), который содержал 25 нг/мл метилнитразепама в качестве внутреннего стандарта, и их концентрацию в экстракте определяли методом ГЖХ с ДЭЗ. Предел обнаружения по диазепаму составляет 5 нг, а по дезметилдиазепаму 10 нг в 1 мл плазмы.

ДЭЗ с изменяемой частотой пульсации напряжения могут работать при намного более низких скоростях газа-носителя, чем детекторы, работающие при постоянной частоте пульсации. Это позволяет работать с намного большей точностью, чем при использовании в качестве внутреннего стандарта медазепама [134]. ГЖХ-метод с ДЭЗ, описанный в работе [151], позволяет анализировать в клинической лаборатории до 40 образцов бензодиазепинов в день с получением в этот же день окончательных результатов. Проведение за 5-месячный период около 1000 анализов образцов сыворотки не выявило каких-либо отрицательных влияний на линейный динамический диапазон детектора в пределах 500-кратной разницы концентраций.

Анализ оксазепама (7-хлор-3-окси-5-фенил-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) является задачей особой важности, поскольку он является основным метаболитом диазепама, обнаруживаемого в моче человека [157], а также метаболитом хлордиазепоксиды [158] и хлоразепата (транксен). Он отличается от диазепама и негидроксилированных бензодиазепинов тем, что в кровяном русле существенная часть оксазепама находится в форме глюкуронида [159]. Для определения оксазепама в биологических жидкостях был описан целый ряд ГЖХ-методов [143, 145, 156, 159].

Лоразепам, производное оксазепама, отличается от последнего только наличием атома хлора в 2'-положении 5-фенильного кольца. Он также является метаболитом нового препарата бензодиазепинового ряда — 2'-хлордезметилдиазепама, образующимся в результате гидроксилирования по С-3. Так как лоразепам более сильный препарат, чем оксазепам, его терапевтическая доза и содержание в биологических жидкостях ниже. Первоначально анализ этого препарата был осуществлен ГЖХ [160—164]. Как свободный, так и конъюгированный лора-

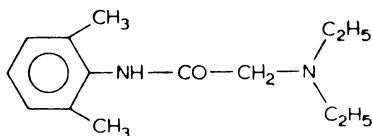
зепам в сыворотке человека определяли ГЖХ с ДЭЗ по методу Кнауэлса и др. [163]. Лоразепам хроматографировали в форме 2-амино-2',5'-дихлорбензофенона на колонке с 3% OV-17. Предел обнаружения метода (на уровне 0,01 мкг/мл) позволял определять концентрацию препарата в плазме и моче даже после дозы в 2 мг.

Нитразепам (7-нитро-5-фенил-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) широко применяется в качестве снотворного средства, превосходящего по антиконвульсивной активности диазепам. Для его определения в биологических жидкостях предлагались различные ГЖХ-методы [133, 134, 149, 165, 172]. Некоторые методы его определения включают стадию кислотного гидролиза до бензофенона [165, 167, 168, 172], что сопряжено с потерей специфичности. Другие методы требуют получения производных, например метилирования [149, 166] или триметилсилилирования [169]. Определение нитразепама в биологических образцах методом ГЖХ с ДЭЗ [168] включает экстракцию препарата и внутреннего стандарта — клоназепама, гидролиз до бензофенонов, которые затем анализируют на колонке с 3% OV-17. Клоназепам при этом превращается в 2-амино-2'-хлор-5-нитробензофенон, который выходит из колонки после продукта гидролиза — нитразепама (2-амино-5-нитробензофенона). В отсутствие измеримых количеств 2-амино-5-нитробензофенона и метаболита нитразепама — 1,3-дигидро-3-окси-7-нитро-5-фенил-2Н-1,4-бензодиазепин-2-она, которые обычно в плазме не обнаруживаются, метод можно рассматривать в качестве специфичного на нитразепам. Он характеризуется количественным извлечением препарата из плазмы (>95%) и пределом обнаружения около 0,1 нг/мл плазмы [168].

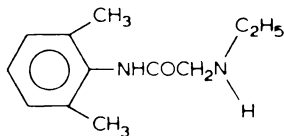
Определение немодифицированных нитразепама и клоназепама в плазме человека на капиллярной колонке с 3% OV-17 и ДЭЗ было описано Де Боером и др. [170]. Клоназепам использовали в качестве внутреннего стандарта при определении нитразепама, и наоборот. После однократной экстракции получали калибровочную кривую, линейную в диапазоне 10—100 нг/мл (стандартное отклонение не более 4,9%). Для обоих препаратов предел обнаружения в плазме составляет около 1 нг/мл. Нитразепам и его основные метаболиты в моче — 7-аминонитразепам и 7-ацетамидонитразепам, как свободные, так и конъюгированные, определяли после однократного перорального приема 5 мг нитразепама, используя 3% OV-101 и ДЭЗ для обнаружения нитразепама и двойного беспламенного азотспецифичного детектора — для его метаболитов. Предел обнаружения составляет примерно 0,2 нг/мл для нитразепама и 50 нг/мл для метаболитов [173].

8.2.5. Антиаритмические препараты

Для лечения заболеваний, характеризующихся избыточной активностью симпатической нервной системы, в настоящее время разработан целый ряд антиаритмических средств и β -адреноблокаторов [174]. В клинической практике для лечения нарушений сердечной деятельности широко используются антиаритмические средства — лидокаин, прокаинамид, пропранолол и хинидин. Для лечения сердечной аритмии, сопровождающей острый инфаркт миокарда, наиболее широко употребляется лидокаин. Определение концентрации этих препаратов в плазме дает возможность, изменяя дозу, достичь терапевтической концентрации препарата в плазме больного. В литературе приведены терапевтические, токсические и летальные концентрации этих препаратов [175—178]. Дезалкилированный метаболит лидокаина (I), образующийся после его введения, моноэтилглицинксилидид (МЭГК) (II), обладает, как сообщалось, около 80% антиаритмической активности исходного препарата, в то время как дидезэтилированный метаболит, глицинксилидиол (ГК), обладает только 10% исходной активности [178].



Лидокаин (I)

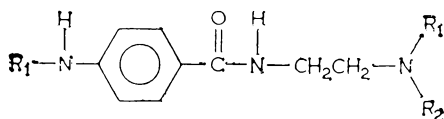


МЭГК (II)

Описан целый ряд ГЖХ-методов определения в биологических материалах только лидокаина [179—183] и лидокаина совместно с его дезалкилированными метаболитами [178, 184—188]. Некоторым из них присущи те или иные недостатки. Например, в условиях ГЖХ на 10% UCW-98 на хромосорбе W не удается полностью разделить лидокаин, МЭГК и ГК, и авторы не приводят также цифры, характеризующие точность метода [184]. В работе [185] описывается ГЖХ-метод количественного определения гептафторбутирильных производных лидокаина и его метаболитов без использования внутреннего стандарта. Для оценки содержания лидокаина, МЭГК и ГК Стронг и сотр. [186, 187] применяли масс-фрагментографию. В качестве неподвижной фазы служила смесь SE-30/OV-17 (3%, в соотношении 6:1) на хромосорбе. Пики, отвечающие метаболитам со свободной и вторичной аминогруппами, были несимметричны, а калибровочная кривая для МЭГК нелинейна ниже 0,5 мкг/мл. Для определения лидокаина и его метаболитов после их перевода в ацетильные производные использова-

ли одноклоночный метод с программированием температуры [188]. Сообщалось о количественном изотермическом ГЖХ-методе определения лидокаина и МЭГК в экстрактах образцов плазмы, не требующем предварительного получения производных [178]. Определение лидокаина и МЭГК проводили на колонке размером $75 \times 0,64$ см, заполненной 2% UCON-75-H-90 000—2% КОН на газохроме Q с размером частиц 80—100 меш, при 175°C с ПИД. Обработка твердого носителя КОН сводила к минимуму адсорбцию аминов и устраняла необходимость превращения в производные для получения симметричных пиков. Сигнал детектора был линейен в диапазоне 0,05—25 мкг для гидрохлорида лидокаина и 0,05—5 мкг для гидрохлорида МЭГК.

Прокаинамид (III) получил широкое распространение для предупреждения или лечения сердечной аритмии. Диапазон его терапевтической концентрации в плазме составляет 4—8 мкг/мл [189]. Саймонс и Леви [190] предложили ГЖХ-метод определения прокаинамида в биологических жидкостях. Метод с использованием в качестве внутреннего стандарта ди-*n*-пропильного аналога прокаинамида (IV) позволяет проводить непосредственное хроматографическое разделение обоих соединений; для него характерны линейная калибровочная кривая и высокая чувствительность, обеспечивающая количественные измерения с нижним пределом в 0,1 мкг/мл. Во избежание гидролиза *N*-ацетилпрокаинамида (V), основного метаболита прокаинамида, методику экстракции модифицировали. Возможности метода были продемонстрированы путем наблюдения за исчезновением прокаинамида из плазмы и мочи больных, принимавших этот препарат. ГЖХ проводили на стеклян-



III, прокаинамид, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

IV, внутренний стандарт, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = -\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$

V, *N*-ацетилпрокаинамид, $R_1 = -\text{COCH}_3$, $R_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

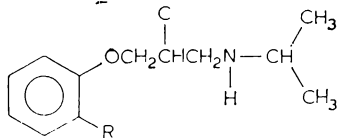
ной колонке размером $91 \times 0,63$ см с 10% OV-7 на газохроме Q при 245°C с использованием ПИД.

8.2.6. Блокаторы β -адренэргических рецепторов

Блокатор β -адренэргических рецепторов пропранолол [1-(изопропиламино)-3-(1-нафтокси)пропанол-2] является эквимольной смесью *D*- и *L*-энантиомеров, различающихся по фармако-

логическому действию [191—193] и кинетике элиминирования [194]. Для сравнения распределения энантиомеров весьма полезно определение их обоих после введения рацемического пропранолола, поскольку только L-изомер влияет на кровоток в печени и опосредованно снижает печеночный клиренс [195]. Недавно разработан [196] ГЖХ-метод одновременного определения энантиомеров пропранолола в биологических образцах на колонке размером 2 м×4 мм с 3% OV-225 на хромосорбе WHP, работающей при 250 °C и оснащенной ДЭЗ для анализа их N-гептафторбутирил-1-пропильных производных и силиловых эфиров. Взаимодействие энантиомеров с оптически активными реагентами приводит к образованию диастереомеров, которые можно разделить ГЖХ [197—201]. Так, например, некоторые антагонисты β-адренорецепторов были разделены на энантиомеры при использовании N-трифторацетил-1-пролилхлорида [197] и N-гептафторбутирил-1-пролилхлорида [200] в качестве хиральных реагентов.

Содержание практолола, 4-(2-окси-3-изопропиламинопропокси)ацетанилида, являющегося β-адреноблокатором, в моче и плазме определяли ГЖХ с ДЭЗ [203]. Анализ проводили на стеклянной колонке размером 3,25 м×3 мм с 4% SE-30 на газохроме Q при 200 °C. Перед анализом практолол и внутренний стандарт (пропранолол) обработкой трифторуксусным ангидридом переводили в трифторацетильные производные. Оксипренолол (IV) является блокатором β-адренэргических рецепторов и, как сообщалось недавно, эффективен при лечении гипертонии во время беременности [204] (в этом отношении он равноценен α-метилдиоксифенилаланину) и улучшает рост плаценты и плода [205]. Для количественного определения этого препарата в биологических жидкостях разработано несколько ГЖХ-методов [206—208]. Однако большинство из них включает длительные и трудоемкие операции экстракции и получения производных. Во всех описанных методиках для получения производных использовали трифторуксусный ангидрид, а бистрифторацетильные производные оксипренола определяли ГЖХ с ДЭЗ. Общий выход продуктов составлял 80±15% при чувствительности обнаружения в плазме 10 нг/мл. Анализ проводили при 158 °C на стеклянной колонке с 3% OV-101 на газохроме Q.



VI, оксипренолол: R = -OCH₂CH=CH₂

VII, алтренолол: R = -CH₂CH=CH₂

8.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В последнее время был опубликован целый ряд книг и обзоров, в которых описываются аппаратурные аспекты ВЭЖХ [1, 209, 210], и общих обзоров о ее применении в анализе фармацевтических препаратов [2, 211—218].

8.3.1. Антikonвульсанты

ГЖХ-анализ антikonвульсантов обычно требует относительно большого количества образца и существенных затрат времени на его предварительную обработку. Более того, в литературе не описан метод с таким набором аналитических условий, которые подходили бы для анализа всех препаратов этого типа. 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 [218—226].

Кабра и др. [218] сообщили об одновременном определении фенобарбитала, фенитоина, примидона, этосукцимида и карбамазепина всего в 25 мкл сыворотки с помощью ВЭЖХ. Антikonвульсанты элюировали с обращенно-фазовой колонки с μ -бондапаком C_{18} фосфатным буфером, содержащим ацетонитрил, и детектировали по поглощению при 195 нм. На проведение анализа требуется около 14 мин при оптимальной температуре колонки 50°C. Нижний предел обнаружения для всех этих веществ не превышает 10 нг, что позволяет легко определить эти вещества при их содержании в сыворотке 1 мкг/мл. Выход пяти препаратов при анализе достигает 97—107% со стандартным отклонением при измерении в разные дни от 3,9 до 5,9%. Среди более чем 30 проверенных препаратов только этотон мешал определению фенобарбитала.

В единственном ВЭЖХ-методе терапевтического мониторинга этосукцимида, теofilлина и ацетаминофена в сыворотке крови человека использовали программируемый автоматический инжектор и обращенно-фазовую колонку с сорбентом μ -бондапак C_{18} [227]. Подвижная фаза состояла из ион-парных буферных систем типа триэтиламин — уксусная кислота или N-этилморфолин — уксусная кислота в водном ацетонитриле при pH 4,8. Этот метод позволяет отделять три упомянутых выше препарата от других 26 лекарственных средств, метаболитов и родственных соединений.

8.3.2. Барбитураты

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. Обращенно-фазовая хроматография барбитуратов изучена достаточно широко [228]. Эти вещества довольно легко разделяются в форме свободных кислот, а при значениях pH, обеспечивающих в основном анионную форму существования барбитуратов в системе, разрешение ухудшается. Таким образом, кислотная форма обеспечивает высокое качество разделения, а анионная — хорошее качество хромофора [229]. Кларк и Чан [230] 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, т. е. хромофорной, форме. Площади пиков барбитуратов после ионизации возрастают в 20 раз.

Джилл и др. [69] применяли эффективную комбинацию трех ВЭЖХ-, двух ГЖХ- и двух ТСХ-методов для идентификации целого набора барбитуратов. Хотя обычно наблюдалась низкая общая корреляция между парами используемых систем для анализа, конкретные группы барбитуратов проявляли весьма высокую корреляцию. Это позволило разработать подход к выбору двух или более систем, для того чтобы увеличить различия в хроматографических свойствах между группами барбитуратов. Колоночная хроматография на липофильных фазах, например ВЭЖХ на октадецилсиликагеле и ГЖХ на SE-30, как оказалось, в наибольшей степени подходит для идентификации барбитуратов. Изменение pH элюента в обращенно-фазовой хроматографии оказалось весьма эффективным при разделении барбитуратов родственной структуры. Например, комбинация двух обращенно-фазовых систем для ВЭЖХ (одна с pH 3,5, вторая с pH 8,5) оказалась весьма полезной при разделении бутабарбитона и втор-бутабарбитона.

8.3.3. Трициклические антидепрессанты

Хотя терапевтические пределы концентраций для трициклических антидепрессантов в плазме были определены с такой же степенью достоверности, как и для других препаратов, обыч-

но составляющих объект клинического мониторинга, например антиэпилептических и сердечных средств, в настоящее время имеется достаточно много информации, чтобы предположить, что измерения концентрации этих препаратов (при подходящих обстоятельствах) могут оказать помощь в проведении фармакотерапии депрессивных больных. В недавнем обзоре [229] обсуждались концентрации трициклических антидепрессантов в плазме и доступные методы их мониторинга. Для этой цели предлагались различные ВЭЖХ-методы в адсорбционном, обращенно-фазовом, распределительном и ион-парном режимах [231—253]. Хотя чувствительность при этом ниже, чем обычно в ГЖХ с азотспецифичным детектором или масс-фрагментографией, она является вполне удовлетворительной при использовании коротковолновых детекторов. Преимущество ВЭЖХ как метода определения препаратов этого класса заключается в том, что ВЭЖХ проще и быстрее, чем ГЖХ, и метаболиты, включая гидроксильированные производные, хорошо хроматографируются на обращенно-фазовых колонках, причем нет необходимости предварительно модифицировать анализируемые соединения [229].

В настоящее время исследователи располагают целым рядом ВЭЖХ-методов анализа кломипрамина, имипрамина и их соответствующих деметилированных метаболитов. Методы, предназначенные для анализа биологического материала, включают ион-парную распределительную [231, 236—240], адсорбционную [233, 241—248] или обращенно-фазовую [249—253] хроматографию. Пределы обнаружения составляют от 1 нг/мл для

Таблица 8.1. Времена удерживания некоторых трициклических антидепрессантов в условиях ВЭЖХ [246]^a

Соединение	Время удерживания, мин	
	Система А	Система Б
Амитриптилин	2,48	5,10
Нортриптилин	11,0	3,70
Кломипрамин	2,74	5,06
Дезметилкломипрамин	14,5	3,50
Имипрамин	3,38	6,16
Десипрамин	19,2	3,86
Протриптилин	10,2	3,70
Тримипрамин	1,72	4,30
Доксепин	3,26	5,84

Колонка 100×4,6 мм (внутр. диаметр); сорбент лихросорб Si 60, размер частиц 5 мкм; система А: гексан — дихлорметан — метанол (8 : 1 : 1), гексан содержал 0,001% метиламина; система Б: 0,05 М NaBr в метаноле.

флуориметрических детекторов [243, 251] до 5—20 нг/мл для ультрафиолетовых детекторов [231, 236, 239—241, 244, 245, 249, 250]. В табл. 8.1 указаны времена удерживания девяти циклических антидепрессантов в условиях ВЭЖХ на колонке с силикагелем [246]. Годбиллон и Гаурон [235] разработали ВЭЖХ-метод определения кломипрамина или имипрамина и их монометилированных метаболитов в крови и плазме человека. В основе метода лежит разделение на колонке с силикагелем в системе этанол — гексан — дихлорметан — диэтиламин (30:62:8:0,005) с обнаружением при 254 нм. Для кломипрамина и имипрамина предел обнаружения составляет 5 нг/мл, для соответствующих монометилированных метаболитов 10 нг/мл.

8.3.4. Бензодиазепины

Наблюдается значительное возрастание потребности в увеличении числа и частоты анализов бензодиазепинов в крови и плазме [254]. ГЖХ с ДЭЗ считается одним из лучших аналитических методов обнаружения этих препаратов, поскольку она удовлетворяет требованиям высокой чувствительности, однако основным ее недостатком в криминалистической токсикологии является отсутствие подходящего метода подтверждения результатов ГЖХ-анализа и надежной идентификации соединений. Поэтому применение ВЭЖХ при определении лекарственных препаратов этого класса все возрастает.

ВЭЖХ использовали для определения диазепама [254—262], хлордиазепоксида [254, 263—268], нитрозепама [269—271], флуниотриазепама [272] и их метаболитов в биологических жидкостях. Котлер и др. [261] разработали ВЭЖХ-метод определения диазепама и его основных метаболитов (оксазепама, темазепама и нордиазепама) в плазме, крови и моче. Метод включает экстракцию биологических жидкостей, забуференных до pH 9,0 смесью бензол—дихлорметан (9:1). Суммарный выход диазепама и его основных метаболитов из плазмы и крови варьирует в пределах от $60 \pm 3,2$ до $89 \pm 13\%$ (стандартное отклонение), а из мочи — в пределах от $79 \pm 7,9$ до $93 \pm 10,5\%$ (стандартное отклонение). Предел обнаружения в плазме и крови по поглощению при 254 нм составляет 50 нг/мл, а в моче (после обработки глюкуронидазой/сульфатазой) — 200 нг/мл. Обращенно-фазовую ВЭЖХ на бондапаке C_{18} (10 мкм) в водном метаноле использовали для изучения изменения концентрации диазепама в плазме человека во времени после перорального приема 10 мг препарата, а также для аналогичных измерений в крови кошек после внутривенного введения диазепама или нордиазе-

пама в дозе 10 мг/кг. Данные определения с помощью ВЭЖХ хорошо коррелировали с результатами ГЖХ—ДЭЗ.

В работе [260] описано разделение и количественное определение бензодиазепинов, присутствующих в сыворотке, слюне и моче в терапевтических концентрациях, методом адсорбционной

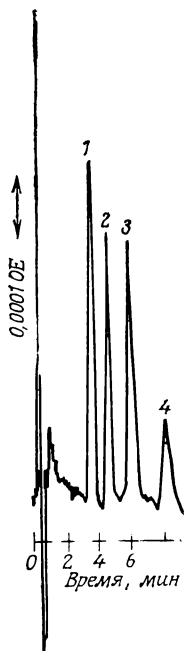


Рис. 8.1. Разделение диазепама и его метаболитов с помощью ВЭЖХ [260] (с разрешения авторов).

Колонка: 300×4,6 мм (внутр. диаметр); сорбент: метилсиликагель Si60; элюент: метанол — 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,0 (2:3); скорость элюирования 20,3 мкл/с; пики: 1 — оксазепам; 2 — эксидиазепам; 3 — дезметилдиазепам; 4 — диазепам.

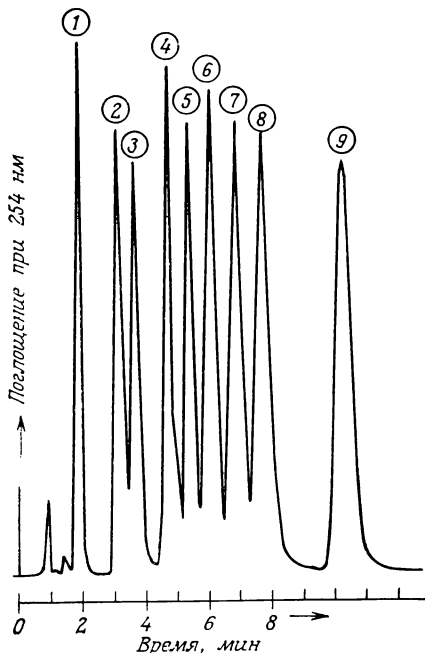


Рис. 8.2. Разделение девяти бензодиазепинов с помощью ВЭЖХ [260] (с разрешения авторов).

Колонка 100×2,8 мм (внутр. диаметр); сорбент: метилсиликагель Si60; элюент: метанол — 0,05 М фосфатный буфер, pH 6,0 (1:1); скорость элюирования 9,3 мкл/с; пики: 1 — 7-аминонитразепам; 2 — бромазепам; 3 — нитразепам; 4 — оксазепам; 5 — дезметилхлордиазепоксид; 6 — оксидиазепам; 7 — хлордиазепоксид; 8 — дезметилдиазепам; 9 — диазепам.

ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме с УФ-детектором, обладающей высокой эффективностью и селективностью. Полное разделение девяти бензодиазепинов на метилсиликагеле в водном 50%-ном метаноле в качестве подвижной фазы происходит за 12 мин. На рис. 8.1 представлено разделение смеси, содержащей 1 нг диазепама и по 2 нг его метаболитов. Было найдено, что пределы обнаружения варьируют от 200 до 340 пкг. На рис. 8.2 приведено разделение смеси девяти бензодиазепинов на

колонке с метилсиликагелем в забуференном фосфатом метаноле (0,05 М, рН 6,0) (1 : 1).

Способность бензодиазепинов поглощать в УФ-диапазоне, термолабильность 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 [257, 259, 264]. Для анализа бензодиазепинов обычно предпочитают обращенно-фазовую хроматографию, поскольку она обеспечивает более высокое качество разделения по сравнению с адсорбционной [261, 264]. Одновременное применение ГЖХ с ДЭЗ и ВЭЖХ для обнаружения и количественного определения диазепама, флуразепама, хлордиазепоксида и их метаболитов в крови и плазме описано в работе [254]. Для обнаружения бензодиазепинов проводили непосредственную экстракцию забуференного образца с последующим анализом небольшой порции экстракта с помощью ГЖХ—ДЭЗ на 3% OV-17. Кровь и плазму затем экстрагировали дополнительной порцией растворителя и экстракт анализировали ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме на колонке с бондапаком C_{18} (внутр. диаметр 4 мм), чтобы подтвердить присутствие бензодиазепинов. Количественное определение проводили одним из двух методов с использованием в качестве внутреннего стандарта флунизтазепама. Для анализа

Таблица 8.2. Хроматографические свойства бензодиазепинов [254]

Соединение	ГЖХ с ДЭЗ	ВЭЖХ	
	Время удерживания, мин	Объем удерживания, мл	
		система А ^б	система Б ^в
Хлордиазепоксид	9,95 (основной пик)	12	<5
Дезметилхлордиазепоксид	Н. а. ^а	9,6	<5
Демоксепам	Н. а. ^а	6,7	<5
Диазепам	2,2	16,1	<5
Дезметилдiazепам	3,3	12,7	<5
Флуразепам	4,6	>25	11,0
Дезалкилфлуразепам	2,5	10,8	<5
Оксазепам	Н. а. ^а	9,8	<5
Празепам	3,8	>25	8,5
Флунизтазепам	3,8	8,2	<5

^а Н. а. — не анализировали.

^б Метанол — фосфатный буфер (58 : 42).

^в Метанол — фосфатный буфер (73 : 37).

дiazепама, дезметилдiazепама, флуразепама и дезалкилфлуразепама использовали ГЖХ—ДЭЗ, а хлордiazепоксид и дезметилхлордiazепоксид анализировали с помощью ВЭЖХ. Хотя аналитическая методика описана для образца объемом 1 мл, при необходимости ГЖХ—ДЭЗ можно применять в скрининге

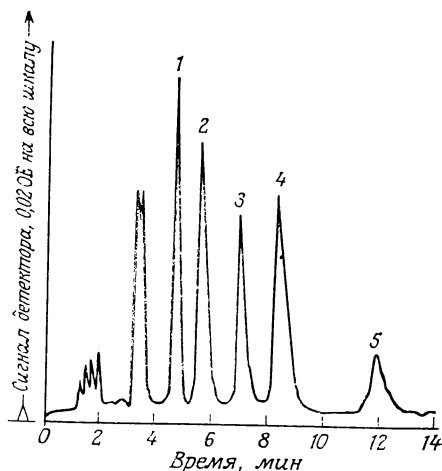


Рис. 8.3. Хроматографическое разделение стандартов, выделенных из плазмы человека, на колонке фирмы Altex [263] (с разрешения авторов).

1 — демокседам (0,4 мкг/мл); 2 — дезметилхлордiazепоксид (0,4 мкг/мл); 3 — нитразепам; 4 — хлордiazепоксид (1 мкг/мл); 5 — дезметилдiazепам (0,4 мкг/мл).

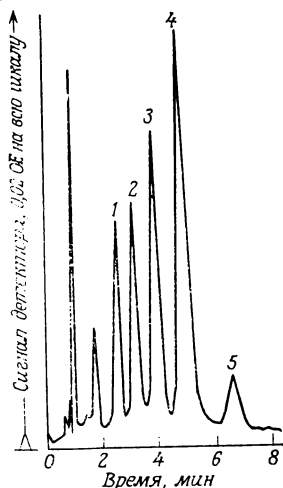


Рис. 8.4. Хроматографическое разделение стандартов, выделенных из плазмы человека, на колонке фирмы Hibar [263] (с разрешения авторов).

1 — демокседам (0,45 мкг/мл); 2 — дезметилхлордiazепоксид (0,35 мкг/мл); 3 — нитразепам; 4 — хлордiazепоксид (0,48 мкг/мл); 5 — дезметилдiazепам (0,4 мкг/мл).

образцов цельной крови или плазмы объемом всего 50 мкл. В табл. 8.2 приводятся хроматографические параметры бензодiazепинов при ГЖХ или ВЭЖХ, определенные в работе [254].

Перчальски и Вайлдер [262] описали определение diaзепамa, нордiazепама и клоназепама в плазме с помощью ВЭЖХ на колонке с пористым силикагелем (партисил-5, размер частиц 5 мкм) в системе циклопентан — хлороформ — ацетонитрил — метанол (58:111:30:1) и обнаружением по поглощению при 254 нм. Нижний предел обнаружения бензодiazепинов после однократной экстракции подщелоченной плазмы смесью бензол — дихлорметан (9:1) составляет 5–10 нг на образец. Относительное стандартное отклонение ~~однодневной~~ и долговременной воспроизводимости составляет 4 и менее 6% соответственно.

Аскалон [263] описал метод определения хлордиазепоксида и его метаболитов обращенно-фазовой ВЭЖХ, пригодный для изучения фармакокинетики этого препарата у человека при долгосрочной терапии. При этом использовались колонки а) фирмы Hibar (250×4 мм), заполненные лихросорбom RP-18 (10 мкм);

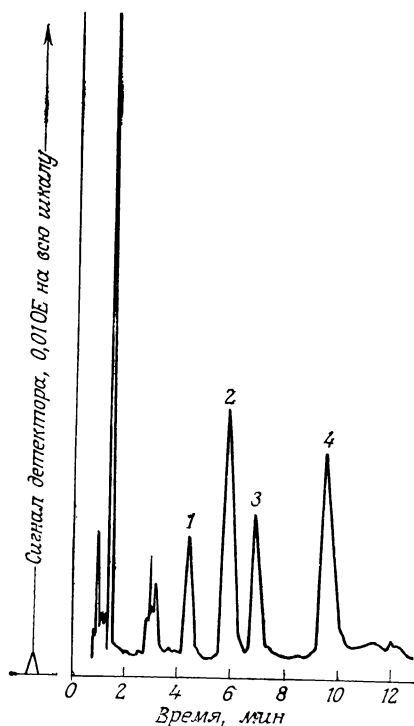


Рис. 8.5. Хроматографическое разделение экстракта плазмы больного через 36 ч после однократного перорального приема 30 мг хлордиазепоксида на колонке фирмы Hibar [263] (с разрешения авторов).

1 — демоксепам; 2 — дезметилхлордиазепоксид; 3 — нитразепам; 4 — хлордиазепоксид.

б) фирмы Altex ($250 \times 3,2$ мм) с тем же сорбентом; в) предколонки, заполненные корасилом (37—50 мкм). Элюирование при скорости потока 2 мл/мин осуществляли 0,1%-ным карбонатом аммония в ацетонитриле (69:31) при давлении 91,5 атм. На рис. 8.3 и 8.4 представлены хроматограммы разделения стандартов, экстрагированных из плазмы человека на колонках Altex и Hibar соответственно. Хроматограмма, приведенная на рис. 8.5, получена при разделении компонентов экстракта плазмы больного через 36 ч после однократного перорального приема 30 мг препарата хлордиазепоксида.

Виттер [273] недавно описал разделение одиннадцати бензодиазепинов на колонке с μ -порасилом (15 см) в изократическом режиме с одновременным детектированием по поглощению при

254 и 280 нм. Готовые формы десяти бензодиазепинов в виде таблеток и порошков экстрагировали хлороформом. Нерастворимую в хлороформе дикалевую соль хлордиазепата перед анализом подвергали декарбоксилированию до N-дезметилдиазепама. Система растворителей состояла из 9 ч. циклогексана и 1 ч. смеси гидроксид аммония — метанол — хлороформ (1 : 200 : 800).

8.3.5. Антиаритмические средства и β -адреноблокаторы

Наряду с ГЖХ для определения лидокаина и прокаинамида в биологических жидкостях применяли множество других методов. Среди них — флуориметрия [274], спектрофотометрия [275] и ВЭЖХ [276, 277]. Какой бы метод ни применялся, существенно, чтобы он обладал высокой точностью и воспроизводимостью, поскольку диапазоны терапевтических концентраций для упомянутых препаратов весьма узки: для прокаинамида, например, 4—8 мг/л [278], для лидокаина — 1—6 мг/л [186, 278]. Адамс и др. [276] сообщали об одновременном определении прокаинамида и лидокаина в терапевтических концентрациях в сыворотке. Перед анализом препараты и добавляемый внутренний стандарт (прокаин) экстрагировали из сыворотки активированным углем. Анализ проводили на обращенно-фазовой колонке (0,5 м × 2,6 мм, ODS-Sil-X-1) в забуференном водном ацетонитриле в качестве подвижной фазы с УФ-детектированием при 205 нм. В серийном анализе при концентрации 1 и 20 мг/л коэффициенты вариации составляли соответственно 10 и 6%. Хроматографическое разделение заканчивалось за 10 мин; полное время анализа составляло 15 мин.

Концентрацию лидокаина (фармакопея США) после инъекций определяли ион-парной ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с октисиликагелем (RP-8) в системе, содержащей 464 мг камфор-10-сульфокислоты в 100 мл смеси метанол — уксусная кислота — вода (30:3:67) в качестве подвижной фазы; для обнаружения использовали УФ-детектор (254 нм) [277]. Концентрация широко употребляемого β -адреноблокатора — пропранолола — в плазме может в процессе лечения варьировать от 20 до 100 нг/мл [278—280], что препятствует применению обычных методов его определения. Концентрацию пропранолола в плазме определяли на обращенно-фазовой колонке с цианпропилсилиланом на силикагеле (μ -бондапак CN) в смеси ацетонитрила с 0,02 М ацетатным буфером при pH 7,0 (7:3) [281]. В этой системе спектрофлуориметрический детектор с возбуждением при 276 нм и эмиссионным фильтром (≥ 340 нм) позволяет обнаруживать пик пропранолола после инъекции 0,8 нг этого препарата.

В работе [282] сообщалось о простом и быстром методе одновременного количественного ВЭЖХ-определения пропранолола и его активного метаболита (4-оксипропранолола) в плазме. Экстракт плазмы хроматографировали на обращенно-фазовой колонке длиной 30 см (μ -бондапак-алкилфенил) в системе ацетонитрил — 0,06%-ная фосфорная кислота (27:73) при скорости потока 2 мл/мин с УФ-детектированием при 205 нм. В образцах плазмы объемом 1 мл пропранолол и 4-оксипропранолол можно

количественно определить в концентрациях 1 и 5 нг/мл соответственно. При этом не наблюдается помех со стороны эндогенных компонентов плазмы или других препаратов, и воспроизводимость метода признана удовлетворительной. Анализ одного образца плазмы занимает около 20 мин. Описанный метод рассматривается в качестве подходящего для рутинного клинического мониторинга концентрации лекарственного вещества в плазме больного и для изучения фармакокинетики.

Недавно был описан количественный метод ВЭЖХ-определения в биологических жидкостях (кровь, плазма, моча, грудное молоко) еще одного β -адреноблокатора — окспренолола [205]. В этом методе применяется экстракция смесью диэтилового эфира с дихлорметаном (4:1), внутренний стандарт (10 мкг гидрохлорида алпренолола (VII) на 100 мкл), колонка с октадецил-силикагелем (Whatman, PXS 10-25, ODS-2, 10 мкм) размером 250×4 мм, а в качестве подвижной фазы 5 мМ 1-октилсульфокислота в 67%-ном водном метаноле (скорость потока 60 мл/ч). Методика приготовления образца достаточно проста и не требует стадий упаривания или получения производных. Полное время анализа одного образца составляет менее 45 мин. Метод позволяет проводить надежное количественное определение 30 нг окспренолола в плазме и обеспечивает нижний предел обнаружения 10 нг/мл в образце объемом 3 мл. Другие антигипертензивные средства (гидралазин, α -метилдиоксифенилаланин и триазидные диуретики, применяемые обычно совместно с окспренололом) не мешают проведению анализа.

Для лечения желудочковой тахикардии и фибрилляции желудочков недавно был выпущен бретилюм (о-бромбензилэтилдиметиламмоний) — четвертичное аммониевое соединение, обладающее антиаритмической активностью [283]. Для его определения описаны различные методы, такие, как колориметрия [285, 286], бумажная хроматография [287] и ГЖХ [288], но все они являются сложными, трудоемкими и требуют проведения экстракции и химической обработки образца перед определением. Применение ВЭЖХ позволило упростить определение бретилюма в готовых лекарственных формах [284]. Метод обладает высокой чувствительностью (50 нг) и воспроизводимостью. Экзогенные добавки при инъекциях, инфузиях или приеме в виде таблеток не мешают анализу, который проводят на колонке с μ -бондапаком CN в системе ацетонитрил — 5 мМ одностамещенный фосфат натрия (3:7) с обнаружением при 254 нм. Кардиодепрессант хинидин широко используют при лечении некоторых видов сердечной аритмии. Однако вследствие небольшой разницы между эффективной и токсической концентрациями (3—5 мкг/мл) [289] для мониторинга концентраций препарата в плазме необходимы быстрые методы, обладающие

высокой чувствительностью и точностью. В готовых формах хинидин присутствует в виде солей и обычно содержит 3—10% дигидрохинидина [290, 291]. В организме человека оба этих соединения подвергаются превращениям, причем основными метаболитами, обнаруженными в моче, являются или 2'-хинидинон и 3-оксихинидин или дигидрированные аналоги [292]. ГЖХ-методы не позволяют разделить хинидин и дигидрохинидин [293, 294]. Для определения хинидина в плазме был разработан быстрый, чувствительный и точный метод с использованием ВЭЖХ, основанный на ион-парной экстракции [295]. Метод, позволяющий разделить хинидин и дигидрохинидин, включает подкисление плазмы хлорной кислотой, экстракцию метилизобутилкетон, промывку экстракта раствором карбоната натрия и хроматографическое разделение на колонке с силикагелем в системе дихлорметан—гексан—метанол—хлорная кислота (600:350:55:1) с флуоресцентным детектированием. Метод обладает чувствительностью до 50 нг/мл (коэффициент вариации 6,6%), и его результаты хорошо согласуются с данными стандартного спектрофотометрического метода [296].

ВЭЖХ также применяли для определения антиаритмических препаратов и β -адреноблокаторов, включая лоркаинид [297], надолол [298] и атенолол [4-(2-окси)-3-изопропиламинопропoxифенилацетамид] [299].

8.3.6. Противоопухолевые препараты

Антагонист фолиевой кислоты метотрексат (МТК) (4-амино-4-дезоксид-N¹⁰-метилптероилглутамат) с последующим введением цитроворум-фактора в качестве биохимического антидота широко используется при химиотерапии многих видов рака у человека [300—304]. 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 [305]. Хотя для анализа метотрексата в плазме предложено множество методов, включая ингибирование ферментов [306, 307], связывание с белком [308], радиоиммунный анализ [309, 310] и флуориметрию [311, 312], 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). Был описан ВЭЖХ-метод определения МТК с флуоресцентным детектированием [313]. Он включает окисление МТК перед проведением хроматографического разделения до флуоресцирующего продукта и не позволя-

ет отличить МТК от 7-ОН-МТК. Позже Уотсон и др. [314] разработали ВЭЖХ-метод анализа на сильном ионообменнике, который позволяет проводить количественное определение как МТК, так и 7-ОН-МТК после приема МТК в высоких дозах.

Для анализа МТК и 7-ОН-МТК в сыворотке больных, проходящих лечение МТК как в традиционных, так и в высоких дозах, применяли обращенно-фазовую ВЭЖХ [305]. Анализ проводили на колонке из нержавеющей стали ($250 \times 4,1$ мм), заполненной RP-8 (размер частиц 10 или 7 мкм), в системе 0,1 М фосфатный буфер (рН 6,8) — метанол (17:3) при скорости потока 1,5 мл/мин. УФ-детектирование при 313 нм в большинстве случаев обеспечивает, при необходимости мониторинга, удовлетворительную чувствительность определения содержания МТК в сыворотке до тех пор, пока его концентрация выше 10^{-7} М [315—317]. Этот метод приблизительно в 2—3 раза чувствительнее, чем методика с использованием анионообменника [314], преимущественно благодаря улучшению формы пиков и отделению мешающих примесей. На колонке с сорбентом диаметром 7 мкм получено более высокое разрешение и пики лучшей формы, чем на колонке с сорбентом диаметром 10 мкм, что позволяет обнаруживать МТК при его содержании в образце 15 нг/мл ($3,3 \cdot 10^{-8}$ М).

Для определения МТК в плазме человека в концентрациях вплоть до 0,01 мкг/мл применяли ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием [318]. МТК стехиометрически окисляли до 2,4-диаминоптеридин-6-карбоновой кислоты — флуоресцирующего продукта, который отделяли от других флуоресцирующих компонентов плазмы на колонке с октадецилсиликагелем. Использовали две системы растворителей: 0,1 М трис, рН которого доводили до 6,7 фосфорной кислотой, и 20%-ный метанол в 0,1 М трис-фосфатном буфере (рН 6,7). При длине волны возбуждения флуориметрического детектора 275 нм зависимость сигнала детектора от концентрации МТК была линейной в диапазоне от 0,01 до 10 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. Метод является быстрым (продолжительность определения 30 мин) и потенциально пригодным для мониторинга концентраций МТК в плазме. Ланкелма и др. [319] определяли концентрацию 7-ОН-МТК в плазме ВЭЖХ с пределом обнаружения $2 \cdot 10^{-8}$ М. Подготовка образца включает только стадию депротенинизации; метод позволяет проводить определение 7-ОН-МТК после приема МТК в относительно невысоких дозах. Метаболит хроматографировали на привитом анионообменнике (партисил SAX) в системе мета-

нол — фосфатный буфер (0,05 М, рН 4,9) (1:4) с обнаружением при 306 нм.

Лоусон и др. [320] описали обращенно-фазовый метод, позволяющий непосредственно вводить надосадочную жидкость после осаждения белка из сыворотки, содержащую МТК и 7-ОН-МТК. Анализ проводили на аналитической колонке (120×4 мм) с подсоединенной предколонкой, заполненных гиперсилом ODS (5 мкм), в качестве подвижной фазы использовали 20%-ный раствор метанола в трис — NaH_2PO_4 -буфере (0,1 М, рН 6,7); соединения обнаруживали по поглощению при 305 нм. Предел обнаружения составлял 100 нг/мл ($2,2 \cdot 10^{-7}$ М) для МТК, причем токсическую концентрацию можно определить даже через 48 ч после инфузии. Подготовка образца к хроматографированию занимает около 20 мин. Метод обладает высокой специфичностью, поскольку МТК и 7-ОН-МТК хорошо отделяются от эндогенных соединений — N^{10} -метилфолиевой кислоты и аминоксантина (примесей в продажном МТК, определение которых становится возможным при проведении курса инфузий с высокими дозами), фолиновой кислоты (цитроворум-фактора, используемого в качестве антидота в курсах с высокими дозами) и 2,4-диамино- N^{10} -метилптероевой кислоты — минорного метаболита.

1-β-D-Арабинофуранозил-цитозин (Ара-Ц) — эффективное лекарственное средство при лечении нелимфоцитарной лейкемии [321]. После введения в организм Ара-Ц быстро инактивируется путем дезаминирования, в результате которого образуется 1-β-D-арабинофуранозил-урацил (Ара-У), и оба соединения одновременно выводятся с мочой [322, 323]. Для оптимизации терапии требуются подходящие методы определения концентрации Ара-Ц в плазме, а для проведения детальных фармакокинетических исследований необходимо оценивать концентрацию как Ара-Ц, так и Ара-У. Для определения Ара-Ц применяли множество методов, включая ферментативные [324], биологические [325], радиоиммунные [326], ГЖХ [327], радиоизотопные (после введения меченого Ара-Ц) [323] и ВЭЖХ [328—331]. Линсен и др. [331] недавно сообщили об определении в плазме человека Ара-Ц и его метаболита Ара-У. После депротеинизации образца плазмы проводили разделение с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с нуклеосилом 10-С-18 (250×4,6 мм, 10 мкм). Элюирование осуществляли 0,2 М однозамещенным фосфатом калия, доведенным до рН 2,0 ортофосфорной кислотой. Ара-Ц детектировали по поглощению при 280 нм, предел его обнаружения в плазме составлял 2 мкг/л, в то время как предел обнаружения Ара-У по поглощению при 264 нм варьировал от 10 до 100 мкг/л. Коэффициент вариации метода в целом составлял около 6% при концентрации Ара-Ц

и Ара-У соответственно выше 5 и выше 100 мкг/л. При более низких концентрациях он составлял около 14%.

Мефалан [4-бис(2-хлорэтил)амино-1-фенилаланин, сокращенно *L*-РАМ] является антинеопластическим алкилирующим агентом, применяемым в клинической терапии множественной миеломы, карциномы яичников и рака груди [332, 333]. Основным продуктом его гидролиза является 4-бис(2-оксиэтил)амино-1-фенилаланин (*L*-ДОН). Определение концентрации самого *L*-РАМ в различных средах осуществляли ГЖХ [334] и ВЭЖХ [335—337]. Для количественного определения *L*-РАМ и *L*-ДОН в биологических образцах Ахмед и Хсу [338] разработали методику с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с чувствительностью $10^{-5}\%$. *L*-РАМ (время удерживания 12 мин) отделяется от *L*-ДОН (6,5 мин), причем их определению не мешают «фоновые» компоненты экстракта (время удерживания 1,4—3 мин). Разделение проводили на колонке ($25 \times 0,26$ см), содержащей HCODS/SIL X-C₁₈ (10 мкм), элюирование — с помощью вогнутого градиента от 12 до 80% ацетонитрила в 17,5 мМ уксусной кислоте. *L*-РАМ и продукт его гидролиза *L*-ДОН обнаруживали при помощи УФ-детектора с переменной длиной волны при 263 нм.

Список других противораковых препаратов, которые в последнее время определяли ВЭЖХ в крови или плазме, включает карминомицин, его основной метаболит — карминомицинол [339] и 10-хлор-5-(2-диметиламиноэтил)-7Н-индол[2,3-С]хинолин-6(5Н)-он [340].

8.3.7. Смеси фармацевтических препаратов

ВЭЖХ применяли для анализа целого ряда микстур, используя предколонку и адсорбцию на амберлите ХАД-2 [341]. Мухаммад и Боднар [342] описали метод количественного определения гуайфенезина, гидрохлорида фенилпропаноламина, бензоата натрия и фосфата кодеина в микстуре от кашля. Этот метод анализа основан на использовании ион-парной ВЭЖХ с гептансульфонатом натрия в качестве противоиона на колонке с μ -бондапакфенилом и детектора с фиксированной длиной волны (254 нм). Общая продолжительность анализа всех активных ингредиентов составляла 22 мин.

Недавно был составлен перечень наиболее употребительных систем для ВЭЖХ препаратов основного характера на примере разделения десяти антигистаминных препаратов [343]. Список используемых лекарств состоял из 100 препаратов основного характера, предложенных Моффатом и сотр. [344, 345]. В табл. 8.3 представлены 15 подвижных фаз для ВЭЖХ, свойства которых были исчерпывающе изучены. Обнаружение про-

Таблица 8.3. Дискриминирующая сила (ДС) хроматографических систем, предназначенных для ВЭЖХ основных лекарственных препаратов [343]

Система	Состав	ДС
А. Микрозернистый силикагель, размер частиц 5 мкм		
1. <i>n</i> -Гептан — изопропанол — пропиламин	100:3:0,5	0,906
2. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — изопропанол — пропиламин	75:25:3:0,3	0,900
3. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — изопропанол — пропиламин	50:50:3:0,3	0,886
4. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — изопропанол — пропиламин	25:75:3:0,3	0,877
5. Дихлорметан — изопропанол — пропиламин	100:3:0,3	0,860
Б. Цианпропильная фаза на микрозернистом силикагеле, размер частиц 10 мкм		
1. Дихлорметан — изопропанол — пропиламин	100:3:0,1	0,892
2. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — изопропанол — пропиламин	50:50:3:0,2	0,893
3. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — ацетонитрил — пропиламин	50:50:25:0,1	0,911
4. <i>n</i> -Гептан — изопропанол — пропиламин	100:25:0,5	0,867
5. Метанол — вода — пропиламин	90:10:0,01	0,851
6. Ацетонитрил — вода — пропиламин	90:10:0,01	0,912
В. Аминопропильная фаза на микрозернистом силикагеле, размер частиц 10 мкм		
1. Дихлорметан — изопропанол — пропиламин	100:3:0,1	0,880
2. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — изопропанол — пропиламин	50:50:3:0,2	0,884
3. <i>n</i> -Гептан — дихлорметан — ацетонитрил — пропиламин	50:50:25:0,1	0,905
4. <i>n</i> -Гептан — изопропанол — пропиламин	100:25:0,5	0,839

Таблица 8.4. Коэффициенты удерживания девяти антигистаминных препаратов [343]

Лекарственный препарат	Коэффициент удерживания		
	система Б3	система Б6	система Б5
Бромдифенгидрамин	0,95	1,54	0,82
Хлорфениламин	8,27	7,51	3,00
Дифенгидрамин	1,16	1,90	1,43
Дифенилпиралин	3,08	3,75	3,09
Мепирамин	2,46	2,99	1,69
Метапирilen	1,98	2,38	1,56
Тенилдиамин	2,62	3,16	1,90
Трипелленамин	2,16	2,87	1,61
Трипролидин	9,09	6,36	2,41

водили при помощи УФ-детектора с фиксированной длиной волны (254 нм). Препарат растворяли в подвижной фазе и для получения подходящего сигнала детектора на колонку наносили от 1 до 10 мкл 0,1%-ного раствора. На трех различных неподвижных фазах было получено хорошее разделение препаратов,

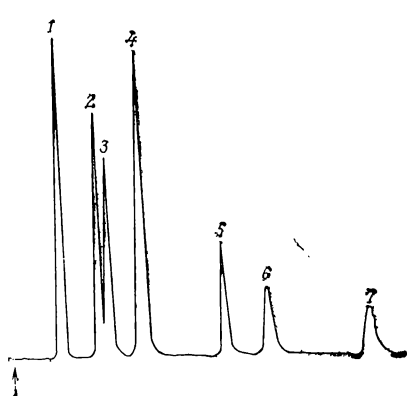


Рис. 8.6. Разделение семи антигистаминных лекарственных препаратов на сорбенте микропак CN-10 при элюировании смесью *n*-гептан—дихлорметан—ацетонитрил—пропиламин (50:50:25:0,1) со скоростью 80 мл/ч [343] (с разрешения авторов).

1 — тримепразин; 2 — прометазин; 3 — ципрогептадин; 4 — трипеленамин; 5 — диметинден; 6 — трипролидин; 7 — антазолин.

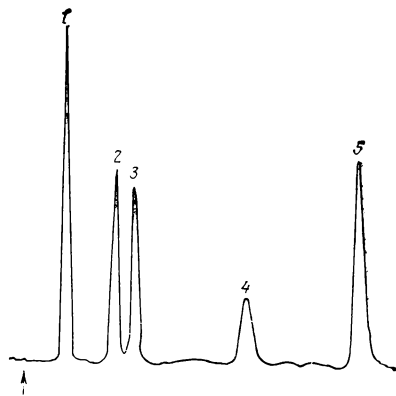


Рис. 8.7. Разделение пяти антигистаминных лекарственных препаратов на сорбенте микропак CN-10 при элюировании смесью *n*-гептан—дихлорметан—ацетонитрил—пропиламин (50:50:25:0,1) со скоростью 30 мл/ч [343] (с разрешения авторов).

1 — буклизин; 2 — хлорциклizin; 3 — дифенгидрамин; 4 — дифенилпиралин; 5 — хлорфенурамин.

причем из пяти систем, обладающих высокой дискриминирующей способностью ($\geq 0,900$), две были адсорбционными (A1 и A2), две — нитрильными (B3 и B6) и одна — аминной (B3). В табл. 8.4 перечислены антигистаминные препараты и значения k' , полученные в подвижных фазах B3 и B6 (предпочтительные системы растворителей) и в другой (менее удовлетворительной) системе B5. На рис. 8.6 и 8.7 приведены хроматограммы двух групп антигистаминных препаратов, к первой из которых относятся семь веществ, хорошо поглощающих в УФ-диапазоне ($E_{1\%} > 100$ при 254 нм), а ко второй — пять соединений, обладающих более низким коэффициентом поглощения в УФ-диапазоне. Разделение всех веществ в обеих группах было хорошим. Хроматографирование этих 12 соединений показало, что всех их, за исключением прометазина и дифенгидрамина, можно отделить друг от друга; последние два вещества разделяются в системе B6. Следовательно, совместное использование обеих систем, B3 и B6, позволит провести полное разделение и

идентификацию изучаемых антигистаминных препаратов. Было сделано также предположение, что в общем случае обе системы можно рассматривать в качестве предпочтительных для разделения лекарственных препаратов основного характера.

В настоящее время широко назначаются индивидуальные анальгетики и их смеси с миорелаксантами; в связи с этим описано много аналитических методов определения салицилатов в готовых лекарственных формах и биологических жидкостях. Например, для определения аспирина, фенаcetина и кофеина в готовых лекарственных формах была предложена автоматизированная ВЭЖХ [346], а Пенг и др. [347] описали простой и быстрый способ одновременного ВЭЖХ-определения аспирина, салициловой кислоты и салицилуrowой кислоты в плазме. Разделение проводили на колонке с μ -бондапаком C_{18} , которую элюировали 30%-ным ацетонитрилом в разбавленной фосфорной кислоте (0,05%-ная, pH 2,5), а обнаружение на УФ-детекторе с перестраиваемой длиной волны. При помощи этого метода можно с высокой точностью одновременно определять содержание салицилуrowой и салициловой кислот и аспирина в одном образце плазмы объемом 0,1 мл при их концентрациях не менее 0,5 мкг/мл. Возможность выделения и оценки концентрации салицилуrowой кислоты позволяет определять это соединение (основной метаболит) в образцах мочи. Предложенный метод пригоден также для определения концентрации аспирина и салицилатов в плазме и изучения их фармакокинетики.

Среди многочисленных методов, предложенных для определения аспирина и салициловой кислоты в фармацевтических препаратах, лишь немногие позволяют проводить одновременно количественное определение обоих компонентов в образцах после их термического разложения или рассматриваются как аналитические методы оценки стабильности. С помощью ВЭЖХ определены свободная салициловая кислота [347—349], аспирин [346, 350] и аспирин с салициловой кислотой [347, 351—353]. В соответствии с методом Тагучи и др. [354] салициловую кислоту и аспирин отделяли от других салицилатов, присутствующих в многокомпонентных таблетках после их термической обработки, и проводили количественное ВЭЖХ-определение путем анализа профильтрованных экстрактов на колонке с силикагелем в системе уксусная кислота — гептан (обнаружение по поглощению при 300 нм). Метод позволяет разделить основные продукты термического разложения таблеток и определить салициловую кислоту с чувствительностью не хуже 0,1 мг в одной таблетке. Хонигберг и др. [355] использовали ВЭЖХ для оптимизации разделения восьми широко назначаемых препаратов, обычно входящих в состав смесей анальгетиков с миорелаксантами. Соединения хроматографировали либо на пористом сили-

кагеле, либо на цианпропильной фазе в различных системах растворителей, сгруппированных попарно в соответствии со схемой селективности Снайдера [356], с целью получения для каждой системы индекса полярности, равного 33. Чтобы показать применимость методов разделения и определения, выбрали смесь каризопродола, фенаcetина и кофеина. Эту смесь хроматографировали на колонке с пористым силикагелем в системе тетрагидрофуран — толуол (1 : 1). Продолжительность одного определения составляет около 8 мин, точность 3—5%.

Для лечения бронхиальной астмы многие годы использовали теофиллин (1,3-диметилксантин). Поскольку оптимальный терапевтический эффект наблюдается при концентрации препарата в плазме на уровне 10—20 мкг/мл, важно проводить быстрый контроль концентрации этого препарата в плазме больных [357]. Успешно развивались и применялись методы выделения препарата, основанные на использовании ГЖХ [358—360] и ВЭЖХ [357, 361—363]. Эппель и др. [357] сравнивали ВЭЖХ и один из методов иммуоферментного анализа (иммунный анализ с ферментным усилением) для определения теофиллина в плазме. ВЭЖХ проводили на колонке с гиперсилом ODS (5 мкм) с элюированием 7%-ным ацетонитрилом в 0,01 М растворе тригидрата ацетата натрия (доведенного до pH 4,0). Среди трех способов подготовки образца (экстракция, осаждение белка и прямой ввод) предпочтение отдавали осаждению белка, хотя воспроизводимость всех трех методов была приемлемой.

Для качественного и количественного анализа стандартных растворов сульфамидов использовали ионообменную [364, 365], ион-парную [366] и обращенно-фазовую ВЭЖХ [367]. Однако аналитические методы, предназначенные исключительно для стандартных растворов, являются неудовлетворительными или недостаточно надежными для клинического мониторинга терапевтических концентраций в биологических жидкостях и для анализа подобных соединений при оценке их токсичности. Субли и Эддс [368] недавно сообщили о ВЭЖХ-методе количественного определения восьми сульфамидов в растворах и в образцах плазмы *in vitro*. Он включает однократную экстракцию препарата из плазмы и, даже без дополнительного концентрирования образца, обеспечивает чувствительность обнаружения 10 нг/мл (по поглощению при 254 нм). Четыре сульфида (сульфамеразим, сульфаметазин, сульфапиридин и сульфатиазол) отделяли от матрикса плазмы с помощью водного метанола (1 : 1) в ацетатном буфере при pH 4,0. Сульфамиды с самыми высокими значениями pK_a , сульфаниламид (10,5) и сульфатуанидин (11,3), отделяли от плазмы в водном метаноле (1 : 1) при pH 7,45.

В современном свиноводстве обычно практикуется введение

животным сульфамидных препаратов для предупреждения и лечения заболеваний, а также для ускорения их роста. Поэтому необходимо проводить контроль продуктов питания человека на содержание в них сульфамидов [369]. Для этих целей предлагали методы ГЖХ [370] и ВЭЖХ [371]. Вилим и др. [369] описали способ обнаружения остатков сульфамидов в почках, печени и мясе свиней, основанный на применении ВЭЖХ. Для предварительных скрининговых тестов использовали как реакцию Браттона — Маршалла, так и ВЭЖХ. Для количественного определения производных стандартов и неизвестных компонентов, образующихся в результате реакции Браттена — Маршалла, использовали ВЭЖХ, а для качественного анализа — ТСХ. Хотя метод скрининга, основанный на применении ВЭЖХ, был первоначально предназначен для определения остатков сульфаметазина, с его помощью можно также разделить 14 других сульфамидов, разрешенных в Канаде для использования в свиноводстве, причем в сочетании с ТСХ, подтверждающей его данные, он является специфичным. ВЭЖХ проводили на обращенно-фазовой колонке С-8 (10 мкм) при элюировании 25%-ным метанолом в 0,01 М ацетате аммония с УФ-детектированием.

8.4. Газовая хроматография — масс-спектрометрия

В настоящее время выпущены книги и обзоры по хромато-масс-спектрометрии (ХМС), затрагивающие как общие вопросы [373—376], так и применение ХМС для анализа в фармацевтике и криминалистике [36, 377—380].

8.4.1. Трициклические антидепрессанты

Для определения трициклических антидепрессантов были разработаны ГХ—МС методы, основанные на детектировании с электронной (ЭИ) или химической ионизацией (ХИ), или методы, сочетающие газовый хроматограф с масс-спектрометром с прямым вводом образца и полевой ионизацией, которые обладают высокой чувствительностью и воспроизводимостью [381—394]. Вильсон и др. [391] отмечали, однако, что, хотя методы масс-фрагментографии [382, 384, 390] и обеспечивают достаточную интенсивность пиков ионов, образующихся в результате ударной ионизации, они часто имеют низкую специфичность.

ГХ—МС применяли для мониторинга в плазме концентраций имипрамина [382—386, 388, 391, 394], кломипрамина [385, 387, 388], амитриптилина [389—391] и их метаболитов. Гарланд и др. [389] недавно описали метод определения амитриптилина и его метаболитов — нортриптилина, 10-оксиамитриптилина и

10-оксинортриптилина — в плазме человека, основанный на использовании методов изотопного разбавления и хроматомасс-спектрометрии с химической ионизацией. Чувствительность определения амитриптилина, нортриптилина и 10-окситриптилина составляла 0,5 нг/мл, 10-оксинортриптилина 1 нг/мл, а ошибка при оценке точности и воспроизводимости определения была менее 5%.

8.4.2. Бензодиазепины

ГХ — МС применяли для определения оксазепам [395—397], хлордезметилдиазепам и лоразепам [398], клоназепам [399—401], флуразепам [402] и их метаболитов в биологических жидкостях. Гарланд и Мин [401] описали определение клоназепам в плазме человека с помощью ГХ — МС с ХИ отрицательными ионами. Чувствительность этого метода ($<0,1$ нг/мл) при одинаковой воспроизводимости определения была приблизительно в 20 раз выше, чем у аналогичного метода с ХИ положительными ионами [400].

8.4.3. Фенацетин и ацетаминофен

Для определения в плазме человека концентрации анальгетика фенацетина и продукта его метаболизма, обладающего анальгетической активностью, — ацетаминофена были разработаны различные ГЖХ-методы с пределом обнаружения 50 нг/мл [403—405]. Чувствительность этих методов вполне приемлема для определения концентрации ацетаминофена, однако она недостаточна для определения фенацетина: его содержание в крови больных с нормальным метаболизмом можно определить лишь в течение нескольких часов после перорального приема терапевтической дозы препарата, а у больных с ускоренным метаболизмом лекарственных препаратов определение фенацетина при помощи этих методов вообще невозможно. Гарланд и др. [406] описали метод определения 1 нг/мл фенацетина в плазме и свободного или конъюгированного ацетаминофена с чувствительностью 0,1 мкг/мл с использованием ГЖХ — МС — ХИ, в котором для определения требуется всего 1,1 мл плазмы. Для того чтобы добиться достаточно высокой чувствительности, в этом методе использовали ион-селективное обнаружение MH^+ -иона фенацетина и метилированного производного ацетаминофена — *n*-ацетанизида. В качестве внутренних стандартов в плазму добавляли дейтерированные аналоги фенацетина и ацетаминофена — фенацетин- d_3 и ацетаминофен- d_3 . Фенацетин, ацетаминофен (парацетамол) и ацетанилид определяли в плазме и моче с помощью масс-фрагментографии при исполь-

зовании дейтерированных аналогов перечисленных выше препаратов [407]. Концентрацию фенаcetина и ацетаминофена в плазме определяли с чувствительностью не менее 20 нг/мл и 1—2 мкг/мл соответственно.

8.5. Тонкослойная хроматография

В настоящее время имеются свежие обзоры по применению ТСХ в анализе фармацевтических препаратов [36, 408—412]. Хотя за ТСХ благодаря низкой стоимости и удобству применения, а также селективности обнаруживающих реагентов закрепились репутация метода, идеального для скрининга лекарственных веществ в токсикологическом анализе, для этого метода часто отсутствуют объективные критерии оценки разделяющей способности [26]. Для классификации хроматографических систем на основании их подобия использовались многочисленные приемы систематизации [413], однако при выборе оптимальных систем [26] более полезным является измерение информационной емкости [414—416] или дискриминирующей способности [417—419].

8.5.1. Лекарственные препараты основного, нейтрального и кислого характера

При оценке дискриминирующей способности учитывают следующие факторы: а) распределение хроматографических параметров внутри полезного диапазона систем, б) корреляцию между системами, в) скорость, г) воспроизводимость, д) чувствительность. Эти факторы рассматривались в работе [419], в которой дискриминирующая способность служила критерием при выборе подходящей системы в ТСХ-анализе основных лекарственных веществ. После того как были выбраны лучшие системы для анализа основных лекарственных веществ, появились возможности стандартизации результатов, полученных в разных лабораториях, и обмен хроматографическими данными между лабораториями [420].

Оуэн и др. [26] применили сходные приемы для выбора ТСХ-системы при анализе обычно встречающихся кислых лекарственных веществ. Дискриминирующую способность 15 систем для ТСХ на силикагеле определяли как индивидуально, так и в комбинации. Выбор проводили среди систем, применяемых в стандартных аналитических тестах на лекарственные вещества [421—423], среди систем, используемых в исследовательских лабораториях криминалистики в Великобритании, и ТСХ-систем, известных из литературных обзоров методов общего скрининга лекарственных веществ [424—426], а также для специфических

лекарственных веществ, например барбитуратов [427—431] и триазидных диуретиков [432, 433]. Оуэн и др. [26] пришли к выводу, что двумя лучшими подвижными фазами являются этилацетат и хлороформ—метанол (9:1) и что комбинация системы этилацетат—метанол—аммиак (17:2:1) с любой из них приводит к получению лучшей пары систем.

Оуэн и др. [434] также сравнивали эффективность 15 систем при ТСХ-разделении на силикагеле обычно встречающихся нейтральных лекарственных веществ. Их дискриминирующую способность также оценивали как индивидуально, так и в комбинации. Наряду с системами, применяемыми в ТСХ бензодиазепинов [435, 436], в этом исследовании изучались ранее рекомендованные системы, предназначенные либо для основных, либо для кислых лекарственных веществ [26, 418, 419]. Кроме того, рассматривалась группа обычно применяемых нейтральных лекарственных препаратов. Было найдено, что система хлороформ—ацетон (4:1) является лучшей подвижной фазой, а в комбинации с системой этилацетат—метанол—аммиак (17:2:1) — лучшей парой систем. Система хлороформ—ацетон (4:1) была рекомендована в качестве лучшей системы при скрининге как кислых, так и нейтральных лекарственных веществ.

8.5.2. Барбитураты

Основной проблемой, возникающей при определении барбитуратов (так же как и других нелетучих органических лекарственных веществ) в биологических образцах, обычно являются выделение и очистка активного ингредиента от избыточного биологического материала. Для разделения, идентификации и определения барбитуратов применялись различные ТСХ-методы [427—431, 437—443]. Процессы разделения исследовали на пластинках из стекловолокна, пропитанных силикагелем, а также на стеклянных и алюминиевых подложках со слоем силикагеля [444, 445]. Для обнаружения барбитуратов описано много методов с чувствительностью от 0,4 до 5 мкг [446—449]. Для обнаружения и определения барбитуратов применяли комбинацию ТСХ и ГЖХ [450, 541]. Сообщалось о нескольких методах идентификации барбитуратов с помощью одномерной [452—454] и двумерной [455] ТСХ, а также об изучении способов количественного ТСХ-определения барбитуратов [456—458]. Абу-Эйтлах и др. [459] для тонкослойного разделения и идентификации целого ряда барбитуратов использовали некоторые новые подходы: приготовление суспензий силикагеля, содержащих щелочь и (или) соли кобальта(II). Силикагель обычно рассматривается в качестве кислого сорбента, и его адсорбционные свойства зависят почти исключительно от поверхностных гидро-

кислых групп. Смешивание силикагеля со щелочью приводит к инаktivации кислотных участков. При увеличении концентрации щелочи кислотные группировки нейтрализуются, и образец прочно адсорбируется на отрицательно заряженных атомах кислорода. Это приводит к уменьшению значений R_f как для барбитуратов, так и для тиобарбитуратов при увеличении pH суспензии. Барбитураты на хроматограммах обнаруживали путем опрыскивания растворами солей Co^{2+} либо Hg^{2+} . Чувствительность определения лекарственных веществ, которая составляет 10 мкг для кобальтового реактива и 1,0 мкг для ртутного, при использовании щелочной суспензии увеличивается до 0,5 мкг.

8.5.3. 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 злоупотреблением и лечению наркомании [7, 460—464]. Мерой степени злоупотребления лекарственными препаратами может служить факт ежегодного тестирования в США 15 миллионов образцов мочи на предмет обнаружения в них наркотиков [461]. Кроме того, массовый анализ образцов мочи для контроля за использованием запрещенных препаратов стал необходимым дополнением к программам борьбы с пагубной привычкой к героину [7].

В ранних работах Доула и др. [465] для обнаружения в моче наркотиков, хинина, барбитуратов, амфетаминов и некоторых транквилизаторов лекарственное вещество сначала адсорбировали на ионообменной бумаге и затем при контролируемом pH экстрагировали органическим растворителем. Аликвотную порцию экстракта концентрировали и анализировали с помощью ТСХ и набора реактивов для опрыскивания. Хотя результаты определения морфина, кодеина и хинина с помощью этого метода были удовлетворительными, он не был пригоден для определения таких препаратов, как метадон, фенobarбитал и амфетамин.

Методы анализа образцов мочи в больших программах по мониторинговому контролю образцов мочи были позднее усовершенствованы [464, 466]. Методика определения включает предварительный спектрофотометрический анализ для выявления образцов мочи, содержащих морфин и (или) хинин, которые затем определяют ТСХ. В нее также входят кислотный гидролиз конъюгатов лекарственного вещества с последующей экстракцией при низком pH для удаления веществ кислотного характера, таких, как барбитураты, дифенилгидантоин, глутетимид и,

экстракция наркотиков, транквилизаторов и амфетаминов при pH 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 или более образцов мочи в день.

Дополнительные методики скрининга лекарственных препаратов были предложены Фудзимото и Вангом [467]. Они включают стадию предварительного выделения лекарственного вещества путем пропускания образцов мочи через колонку со смолой амберлит XAD-2, затем кислотные и основные соединения элюируют и разделяют с помощью ТСХ. Другие методы скрининга мочи, применяемые для анализа наркотиков, описаны в работах Валласа с сотр. [462, 468] и Каисты с сотр. [460, 469—471]. Каиста [7] опубликовал также руководство по анализу мочи в рамках программ по предотвращению злоупотребления наркотиками и терапевтическому лечению с использованием нескольких препаратов. Метод, основанный на однократной экстракции и идентификации с помощью ТСХ, позволяет обнаруживать большое число наркотических средств [460]. Лекарственное вещество адсорбируют на листе бумаги размером 6×6 см со слоем нанесенной катионообменной смолы SA-2 и затем элюируют с бумаги раствором хлорида аммония (pH 10,1). Одновременную ТСХ седативных, гипнотических, наркотических анальгетиков, стимуляторов центральной нервной системы и других лекарственных веществ проводят путем нанесения экстракта на готовые силикагелевые пластинки с микроволокнистой основой (Gelman, ITLC, тип SA), на которых затем проводят двухстадийное проявление и получают хроматограммы с оптимальным разделением широкого круга лекарственных веществ. После этого для обнаружения продуктов на различные обозначенные участки проявленной хроматограммы последовательно наносят обнаруживающие реагенты. Этот метод позволяет определять в моче до 0,15 мкг/мл морфина, 1,0 мкг/мл амфетаминсульфата, 0,5 мкг/мл метамфетамингидрохлорида, 0,5 мкг/мл фенметразингидрохлорида, 0,5 мкг/мл кодеинфосфата, 1,0 мкг/мл метадонгидрохлорида, 0,36 мкг/мл секобарбитала и 0,5 мкг/мл фенобарбитала. Для достижения таких пределов обнаружения требуется не менее 20 мл мочи. Во многих случаях, конечно, необходимо подтверждать позитивные результаты ТСХ-скрининга методами ГХ и (или) УФ- или ИК-спектроскопии, поскольку эти результаты имеют большое значение с социальной и юридической точек зрения [463].

В последнее время постоянно возрастает употребление анорексигенных препаратов, в основном при лечении ожирения, которые проявляют побочное стимулирующее действие на цент-

ральную нервную систему [472—476]. Особое внимание в этой связи привлекают фенметразин (прелудин, 3-метил-2-фенилморфолин), диэтилпропион (тенурат, тепранил), фенфлурамин, хлорфентермин, фендиметразин, мазиндол и фентермин. Винек и др. [477] описали обнаружение восьми интерферирующих аноксигенных препаратов, обладающих стимулирующим действием на центральную нервную систему, при скрининге лекарственных веществ в моче с помощью ТСХ в сочетании с иммуноферментным анализом (метод ферментного усиления). Лекарственные вещества экстрагировали из образца забуференной боратом мочи (рН 9,25) смесью дихлорметана с изопропанолом (9:1), экстракт наносили на пластинки линейар К с предсорбентом Е (Whatman) и хроматографировали в системе этилацетат — метанол — вода — гидроксид аммония (85:13:5:1). Обнаружение осуществляли с помощью нингидрина, УФ-облучения и реактива Драгендорфа [478]. Пределы обнаружения составляли: 0,1 мкг/мл для диэтилпропиона, фендиметразина и мазиндола, 0,3 мкг/мл для фенфлурамина, 0,5 мкг/мл для фенметразина и 1,0 мкг/мл для фентермина, хлорфентермина и хлортермина.

8.5.4. Антиаритмические средства и β -адреноблокаторы

Христиансен [479] описал микрометод, основанный на определении хинидина и салициловой кислоты непосредственно при помощи ТСХ образцов сыворотки и плазмы объемом 10 мкл. Образец без экстракции наносили на слой силикагеля, белок в зоне нанесения осаждали этанолом. Количественную оценку хроматограмм проводили путем флуориметрического сканирования с возбуждением при 366 нм и эмиссией при 456 нм после проявления в системе бензол — диэтиловый эфир — ледяная уксусная кислота — метанол (120:60:18:1).

Сообщали о количественном ТСХ-определении в плазме прокаинамида и его основного метаболита — N-ацетилпрокаинамида [480]. Этот метод включает экстракцию дихлорметаном при высоком рН, хроматографирование в системе бензол — 28%-ный гидроксид аммония — диоксан (2:3:16) и прямое измерение поглощения компонентов на пластинке при ее УФ-облучении светом с длиной волны 275 нм. Нижний предел обнаружения составляет 10 нг, в диапазоне 10—200 нг наблюдается линейная зависимость площади пика от количества вещества в пятне. Выход обоих лекарственных веществ при экстракции из плазмы варьировал от 95,4 до 104,8%. Этот метод рекомендован для использования в клинических тестах и в фармакокинетических исследованиях.

Стейн [481] описал чувствительный и селективный ТСХ-метод одновременного определения β -адреноблокатора — ацебуто-

лола [DL-1-(2-ацетил-4-*n*-бутирамидофенокс)-2-окси-3-изопропиламинопропана] и его основного метаболита [DL-1-(2-ацетил)-4-ацетамидо-2-окси-3-изопропиламинопропана] в сыворотке. Образец сыворотки объемом 2 мл, содержащий в качестве внутреннего стандарта 350 нг хинидина, экстрагировали при рН 10, растворитель упаривали и остаток растворяли в 50 мкл метанола. Аликвотную порцию этого раствора объемом 10 мкл хроматографировали на готовых пластинках с силикагелем-60 в в системе этилацетат — метанол — аммиак (15:4:1). Флуоресценцию измеряли при длине волны возбуждения 350 нм и длине волны испускания 450 нм.

Для чувствительного и селективного определения пропранолола и семи его возможных метаболитов использовали быструю последовательную ТСХ на пластинках из стекловолокна, пропитанных силикагелем [482]. Первая подвижная фаза содержит смесь ацетонитрил — бензол — *n*-гексан — гидроксид аммония (80:40:40:1), вторая — *n*-гексан — диэтиловый эфир (9:1). Эта методика удобна, воспроизводима и занимает всего 23 мин.

8.5.5. Ион-парная тонкослойная хроматография

Ион-парная ТСХ позволяет получать хорошие результаты при разделении катехоламинов [483], первичных ароматических аминов [484, 485] и сульфамидов [485]. Лепри и др. [485] изучали поведение целого ряда сульфамидов на слоях силанизированного силикагеля, пропитанного додецилбензолсульфонатом триэтаноламина и хлоридом *N*-додецилпиридиния. В работе изучалось влияние типа детергента, содержания органического растворителя в элюенте и кажущегося рН элюента на хроматографические свойства сульфамидов. С помощью ион-парной ТСХ можно проводить разделения многих сульфамидов и ароматических аминов, которые не поддаются разделению на ионитах.

8.5.6. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

Ли и др. [486] описали одновременное ВЭТСХ-определение пяти антиаритмических лекарственных препаратов. Полное разделение всех компонентов и клозапина в качестве внутреннего стандарта достигалось проявлением пластинки в двух системах растворителей различной полярности: бензол — этилацетат — метанол (4:4:1) и бензол — этилацетат — метанол — пиридин (4:2:3:3). Пятна лидокаина и дифенилгидантоина после проявления в первой системе сканировали при 220 нм, а прокаинамида, пропранолола и хинидина — после второго при 290 нм.

Относительное стандартное отклонение определения в зависимости от природы и концентрации лекарственного вещества варьировало в пределах от 3 до 14%.

Недавно были описаны [487] свойства и селективность органических модификаторов — метанола, этанола, изопропанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана — в обращенно-фазовой ВЭТСХ целого ряда фармацевтических продуктов, представляющих интерес с точки зрения токсикологии. Этанол, по-видимому, является наиболее селективным органическим модификатором, а изопропанол — наиболее интересным с точки зрения переноса условий ВЭТСХ на ВЭЖХ. В каждом случае лучшее разрешение наблюдалось при содержании в подвижной фазе от 40 до 50% воды.

Литература

1. Lawrence J. F. *Anal. Chem.*, **52**, 1122A (1980).
2. Baker J. K., Skelton R. E., Ma C.-Y. *J. Chromatogr.*, **168**, 417 (1979).
3. Williams R. C., Viola J. L. *J. Chromatogr.*, **185**, 505 (1979).
4. Snyder L. R., Dolan J. W., Tanaka N. *Clin. Chem.*, **25**, 1117 (1979).
5. Bethke H. *Chromatographia*, **12**, 335 (1979).
6. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss F. W. *J. Chromatogr.*, **222**, 13 (1981).
7. Kaistha K. K. *J. Chromatogr.*, **141**, 145 (1977).
8. McFadden W. H. *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 97 (1980).
9. McFadden W. H. *Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. — New York: Wiley-Interscience, 1973.
10. Karger B. L., Kirby D. P., Vouros P., Foltz R. L., Hidy B. *Anal. Chem.*, **51**, 2324 (1979).
11. Jones P. R., Yang S. L. *Anal. Chem.*, **47**, 1000 (1975).
12. Henion J. D. *Anal. Chem.*, **50**, 1687 (1978).
13. McFadden W. H., Bradford D. C., Games D. E., Gower J. L. *Amer. Lab.*, **9**, 55 (1977).
14. Hirata Y., Takeuchi T., Tsuge S., Yoshida Y. *Org. Mass Spectrom.*, **14**, 126 (1979).
15. Zlatkis A., Poole C. F. *Anal. Chem.*, **52**, 1002A (1980).
16. Decker W. J. *Clin. Toxicol.*, **10**, 23 (1977).
17. Gohlke R. S. *Anal. Chem.*, **31**, 535 (1959).
18. Costello C. E., Hertz H. S., Sakai T., Biemann K. *Clin. Chem.*, **20**, 255 (1974).
19. Rand M. E., Hammond J. D., Moscou P. J. *J. Amer. Coll. Health Assoc.*, **17**, 43 (1968).
20. Saferstein R., Manura J. J., Bretell T. A., De P. K. *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 245 (1978).
21. Ullucci P. A., Cadoret R., Stasiowski P. D., Martin H. F. *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 33 (1978).
22. Cailleux A., Turcant A., Premel-Cabic A., Allain P. *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 163 (1981).
23. Skinner R. F., Gallaher F. J., Knight J. B., Bonelli E. J. *J. Forensic Sci.*, **17**, 189 (1972).
24. Finkle B. S., Taylor D. M., Bonelli E. J. *J. Forensic Sci.*, **17**, 189 (1972).
25. Finkle B. S., Foltz R. L., Taylor D. M. *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 304 (1974).
26. Owen P., Pendlebury A., Moffat A. *J. Chromatogr.*, **164**, 195 (1978).

27. *Brinkman U. A. T., de Vries G. J.* High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **2**, 79 (1979).
28. *Brinkman U. A. T., de Vries G. J.* Chromatogr., **192**, 331 (1980).
29. *Siouffi A. M., Wawrzynowicz T., Bressolle F., Guiochon G. J.* Chromatogr., **186**, 563 (1979).
30. *Kaiser R. E., Rieder R. J.* Chromatogr., **142**, 411 (1976).
31. *Nicholson J. D.* Analyst (London), **103**, 193 (1978).
32. *Betts T. J.* Aust. J. Pharm. Sci., NS7 (2), 54 (1978).
33. *Zlatkis A., Poole C. F.* Anal. Chem., **52**, 1002A (1980).
34. *Criffin W. J., Groves G. A., Harris W. A., Rawel B. D., Stewart P. J.* Aust. J. Pharm. Sci., NS7, 2 (1978).
35. *Reid E.* Methodological Developments in Biochemistry. Vol. 5. — Amsterdam: North-Holland, 1976.
36. *Gilpin R. K.* Anal. Chem., **51**, 275R (1979).
37. *Cram S. P.* Anal. Chem., **52**, 324R (1980).
38. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry, Vol. 1, Respiratory Gases, Volatile Anesthetics, Ethyl Alcohol and Related Toxicological Materials. — New York: Dekker, 1977, p. 233.
39. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry, Vol. 2, Hypnotics, Anti-Convulsant and Sedatives. — New York: Dekker, 1977, p. 493.
40. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry, Vol. 3, Antipsychotic, Antiemetic and Antidepressant Drugs. — New York: Dekker, 1977, p. 268.
41. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry, Vol. 4, Central Nervous Systems Stimulants. — New York: Dekker, 1977, p. 458.
42. *Gudzinowicz B. J., Gudzinowicz M. J.* Analysis of Drugs and Metabolites by Gas Chromatography — Mass Spectrometry, Vol. 5, Analgesics, Local Anesthetics and Antibiotics. — New York: Dekker, 1977, 541.
43. *Baselt R. C.* Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Vol. 1, Centrally Acting Drugs. — CT. Canton: Biomed. Publ., 1978.
44. *Baselt R. C.* Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Vol. 2, Peripherally Acting Drugs and Common Toxic Chemicals. — CT. Canton: Biomed. Publ., 1978.
45. *Berman E.* Analysis of Drugs of Abuse. — London: Heyden, 1977.
46. *Cramers C. A., Vermeer E. A., van Kuik L. G., Hulsman J. A., Meijers C. A.* Clin. Chim. Acta, **73**, 97 (1976).
47. *Pippenger C. I., Gillen H. W.* Clin. Chem., **15**, 582 (1969).
48. *Kupfenberg H. J.* Clin. Chim. Acta, **29**, 283 (1970).
49. *Macgee J.* Anal. Chem., **42**, 421 (1970).
50. *Goudie J. H., Burnett D.* Clin. Chim. Acta, **43**, 423 (1973).
51. *Davis H. L., Falk K. J., Bailey D. G. J.* Chromatogr., **107**, 61 (1975).
52. *Woodbury D. M., Penry J. K., Schmidt R. P.* Antiepileptic Drugs. — New York: Raven, 1972.
53. *Vesell E. S., Parsananti G. T.* Clin. Chem., **17**, 851 (1971).
54. *Abraham C. V., Joslin H. D. J.* Chromatogr., **128**, 281 (1976).
55. *Baumel I. P., Gallagher B. B., Mattson R. H.* Arch. Neurol., **27**, 34 (1972).
56. *Kananen G., Osiewicz R., Sunshine I. J.* Chromatogr. Sci., **10**, 283 (1972).
57. *Hill R. E., Latham A. N.* J. Chromatogr., **131**, 341 (1977).
58. *Abraham C. V., Gresham D. J.* Chromatogr., **136**, 332 (1977).
59. *Sengupta A., Peat M. A. J.* Chromatogr., **137**, 206 (1977).
60. *Godolphin W., Thoma J.* Clin. Chem., **24**, 483 (1978).
61. *Dorrity F., Jr., Linnoila M.* Clin. Chem., **22**, 860 (1976).
62. *Cramers C. A., Rijks J. A., Bocek K.* Clin. Chim. Acta, **34**, 159 (1971).
63. *Gupta R. N., Keane P. M.* Clin. Chem., **21**, 1346 (1975).

64. *Driessen O., Emonds A.* Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C., **77**, 171 (1974).
65. *Jensen C. J., Gugler R. J.* Chromatogr., **137**, 188 (1977).
66. *Meijer J. W. A.* Epilepsia, **12**, 341 (1971).
67. *Dijkhuis I. C., Vervloet E.* Pharm. Weekbl., **109**, 42 (1974).
68. *Schoheen F., van der Kleijn E.* Pharm. Weekbl., **109**, 30 (1974).
69. *Gill R., Stead A. H., Moffat A. C. J.* Chromatogr., **204**, 275 (1981).
70. *Toseland P. A., Grove J., Berry D. J.* Clin. Chim. Acta, **38**, 321 (1972).
71. *Welton B.* Chromatographia, **3**, 211 (1970).
72. *Berry D. J. J.* Chromatogr., **86**, 89 (1973).
73. *Hall R. C., Risk C. A. J.* Chromatogr. Sci., **13**, 519 (1975).
74. *Chang T., Glazko A. J. J.* Lab. Clin. Med., **75**, 145 (1968).
75. *Holtzman J. L., Alberts D. S.* Anal. Biochem., **43**, 48 (1971).
76. *Street H. V. J.* Chromatogr., **41**, 358 (1969).
77. *Walle T. J.* Chromatogr., **114**, 345 (1975).
78. *Sandberg D. H., Resnick G. L., Bacallo C. Z.* Anal. Chem., **40**, 736 (1968).
79. *Baylis E. M., Fry D. E., Marks V.* Clin. Chim. Acta, **30**, 93 (1970).
80. *Cook J. G. H., Riley C., Nunn R. F., Budgen D. E. J.* Chromatogr., **6**, 182 (1961).
81. *Couch M. W., Greer M., Williams C. M. J.* Chromatogr., **87**, 559 (1973).
82. *Martin H. F., Driscoll J. L.* Anal. Chem., **38**, 345 (1966).
83. *Robb E. W., Westbrook J. J.* Anal. Chem., **35**, 1644 (1963).
84. *Stevenson G. W.* Anal. Chem., **38**, 1948 (1966).
85. *Barrett M. J.* Clin. Chem. Newsl., **3**, 1 (1971).
86. *De Graeve J., Vanroy J. J.* Chromatogr., **129**, 171 (1976).
87. *Wu A., Pearson M. L.* Anal. Lett., **10**, 381 (1977).
88. *Brochmann-Hanssen E., Oke T. O. J.* Pharm. Sci., **58**, 370 (1969).
89. *Hammer R. H., Wilder B. J., Streiff R. R., Mayersdorf A. J.* Pharm. Sci., **60**, 327 (1971).
90. *Osiewicz R., Aggarwal V., Young R. M., Sunshine I. J.* Chromatogr., **88**, 157 (1974).
91. *Wu A.* Clin. Chem., **20**, 630 (1974).
92. *Callery P. S., Leslie J.* Clin. Chem., **22**, 22 (1976).
93. *Rutten G. A. F. M., Luyten J. A. J.* Chromatogr., **74**, 177 (1972).
94. *Wetzels M. L.* Thesis. — Eindhoven: Technische Hogeschool, 1975.
95. *Hall R. C., Risk C. A. J.* Chromatogr., **13**, 519 (1975).
96. *Sun S. R., Hoffman D. J.* Pharm. Sci., **68**, 386 (1979).
97. *Dunges W., Bergheim-Irps E.* Anal. Lett., **6**, 185 (1973).
98. *Elahi N. J.* Anal. Toxicol., **3**, 35 (1979).
99. *Orsulak P. J., Schildkraut J. T.* Ther. Drug Monitor., **1**, 199 (1979).
100. *Gupta R., Molnar G.* Drug Metab. Rev., **9**, 79 (1979).
101. *Gram L. F.* Clin. Pharmacokinet., **3**, 237 (1977).
102. *Jorgensen A.* Acta Pharm. Toxicol., **36**, 79 (1975).
103. *Cooper T. B., Allen D., Simpson G. M.* Psychopharm. Commun., **1**, 445 (1975).
104. *Cooper T. B., Allen D., Simpson G. M.* Psychopharm. Commun., **2**, 105 (1975).
105. *Bailey D. N., Jatlow P. I.* Clin. Chem., **22**, 777 (1976).
106. *Bailey D. N., Jatlow P. I.* Clin. Chem., **22**, 1967 (1976).
107. *Gifford L. A., Turner P., Pare C. M. B. J.* Chromatogr., **105**, 107 (1975).
108. *Bertrand M., Dupuis C., Gagnon M. A., Dugal R.* Clin. Biochem., **154**, 117 (1978).
109. *Reite S. F.* Medd. Nor. Farm. Selsk., **37**, 76 (1975).
110. *Gupta R. N., Molnar G., Hill R. E., Gupta M. I.* Clin. Biochem., **5**, 247 (1976).
111. *Dawling S., Braithwaite R. A. J.* Chromatogr., **146**, 449 (1978).
112. *Vasillades J., Bush K. C.* Anal. Chem., **48**, 1708 (1976).

113. *Midha K. K., Charette C., Cooper J. K., McGilveray I. J. J. Anal. Toxicol.*, **4**, 237 (1980).
114. *Rovei V., Sanjuan M., Hrdina P. D. J. Chromatogr.*, **182**, 349 (1980).
115. *Antal E., Mercik S., Kramer P. A. J. Chromatogr.*, **183**, 149 (1980).
116. *Jorgensen A. Acta Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 79 (1975).
117. *Mitchell W. D., Webb S. F., Padmore G. R. Ann. Clin. Biochem.*, **16**, 47 (1979).
118. *Dorritz F., Linnoila M., Habig R. L. Clin. Chem.*, **23**, 1326 (1977).
119. *Dhar A. K., Kutt H. Ther Drug Monit.*, **1**, 209 (1979).
120. *Bredesen J. E., Ellingsen O. F., Karlson J. J. Chromatogr.*, **204**, 361 (1981).
121. *Braithwaite R. A., Widdop B. Clin. Chim. Acta*, **35**, 461 (1971).
122. *Hucker H. B., Stauffer S. C. J. Pharm. Sci.*, **63**, 296 (1974).
123. *O'Brien J. E., Hinsvark O. N. J. Pharm. Sci.*, **65**, 1068 (1976).
124. *Corona G. L., Bonferoni B. J. Chromatogr.*, **124**, 401 (1976).
125. *Nyberg G., Martensson E. J. Chromatogr.*, **143**, 491 (1977).
126. *Wallace J. E., Hamilton H. E., Goggin L. K., Blum K. Anal. Chem.*, **47**, 1516 (1975).
127. *Borga O., Garle M. J. Chromatogr.*, **68**, 77 (1972).
128. *Kragh-Sorensen P., Hansen C. E., Carsen N. E., Noestoft J., Hvidberg E. F. Psychol. Med.*, **4**, 174 (1974).
129. *Streator J. T., Eichmeier L. S., Caplis M. E. J. Anal. Toxicol.*, **4**, 58 (1980).
130. *Moody J. P., Whyte S. F., Naylor G. J. Clin. Chim. Acta*, **43**, 355 (1973).
131. *Shader R. I., Greenblatt D. J. Benzodiazepines in Clinical Practice.* — New York: Raven, 1974.
132. *Cushman P., Benzer D. Drug Alcohol Depend.*, **6**, 365 (1980).
133. *Clifford J. M., Smyth W. F. Analyst (London)*, **99**, 241 (1974).
134. *Hailey D. M. J. Chromatogr.*, **98**, 527 (1974).
135. *Klotz U., Avent G. R., Hoyumpa A., Schenber S., Wilkinson G. R. J. Clin. Invest.*, **55**, 347 (1974).
136. *Kaplan S. A., Jack M. L., Alexander K., Weinfeld R. E. J. Pharm. Sci.*, **62**, 1789 (1973).
137. *Berlin A., Siwers B., Agurell S., Hiort A., Sjöqvist F., Ström S. Clin. Pharmacol. Ther.*, **13**, 733 (1972).
138. *Weinfeld R. E., Posmanter H. N., Khoo K.-C., Puglisi C. V. J. Chromatogr.*, **143**, 581 (1977).
139. *McCurdy H. H., Slightom E. L., Harrill J. C. J. Anal. Toxicol.*, **3**, 195 (1979).
140. *Dhar A. K., Kutt H. Clin. Chem.*, **25**, 137 (1979).
141. *Steyn J. M., Hundt H. K. L. J. Chromatogr.*, **107**, 196 (1975).
142. *Ferguson J. L., Couri D. J. Anal. Toxicol.*, **3**, 171 (1979).
143. *Rutherford D. M. J. Chromatogr.*, **137**, 439 (1977).
144. *Rey E., Turquais J. M., Oliver G. Clin. Chem.*, **23**, 1338 (1977).
145. *de Silva J. A. F., Puglisi C. V. Anal. Chem.*, **42**, 1725 (1970).
146. *Zingales I. A. J. Chromatogr.*, **75**, 55 (1973).
147. *Howard A. G., Nickless G., Hailey D. M. J. Chromatogr.*, **90**, 325 (1974).
148. *Arnold E. Acta Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 335 (1975).
149. *de Silva J. A. F., Bekersky I., Puglisi C. V., Brooks M. A., Weinfeld R. E. Anal. Chem.*, **48**, 10 (1976).
150. *de Gier J. J., t'Hart B. J. J. Chromatogr.*, **163**, 304 (1979).
151. *Linnoila M., Dorrity F., Jr. Acta Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 458 (1977).
152. *Gelbke H. P., Schlicht H. J., Schmidt G. Arch. Toxicol.*, **38**, 295 (1977).
153. *de Silva J. A. F., Schwartz M. A., Stefanovic V., Kaplan J., D'Arconte L. Anal. Chem.*, **36**, 2099 (1964).
154. *Hoffman D. J., Chon A. H. C. J. Pharm. Sci.*, **64**, 1668 (1975).
155. *Greenblatt D. J. J. Pharm. Sci.*, **67**, 427 (1978).

156. Kelly R. C., Anthony R. M., Krent L., Thompson W. L., Sunshine I. Clin. Toxicol., 14, 445 (1979).
157. Zingales I. A. J. Chromatogr., 54, 15 (1971).
158. Kimmel H. B., Walkenstein S. S. J. Pharm. Sci., 56, 538 (1967).
159. Knowles J. A., Ruelius H. W. Arzneim-Forsch., 22, 687 (1972).
160. Vessman J., Freij G., Stronberg S. Acta Pharm. Suecica, 9, 447 (1972).
161. Wretling M., Pilbrant A., Sundwall A., Vessman J. Acta Pharmacol. Toxicol., 40 (Suppl. 1), 28 (1977).
162. Lanzoni J., Airoidi L., Marcucci F., Mussini E. J. Chromatogr., 168, 260 (1979).
163. Knowles J. A., Comer W. H., Ruelius H. W. Arzneim.-Forsch., 21, 1055 (1971).
164. Marcucci F., Mussini E., Airoidi L., Guaitani A., Garattini S. J. Pharm. Pharmacol., 24, 63 (1972).
165. Møller Jensen K. J. Chromatogr., 111, 389 (1975).
166. Ehrsson H., Tilly A. Anal. Lett., 6, 197 (1973).
167. Viala A., Cano J. P., Angeletti-Philippe A. Eur. J. Toxicol., 4, 109 (1971).
168. Beharrell G. P., Hailey D. M., McLaurin M. K. J. Chromatogr., 70, 45 (1972).
169. Greaves M. S. Clin. Chem., 20, 141 (1974).
170. de Boer A. G., Röst-Kaiser J., Bracht H., Breimer D. D. J. Chromatogr., 145, 105 (1978).
171. Kangas L. J. Chromatogr., 172, 273 (1979).
172. Matsuda Y. Jap. J. Leg. Med., 25, 445 (1971).
173. Kangas L. J. Chromatogr., 172, 273 (1979).
174. Clarkson K., Tucker H., Wale J. Annual Reports in Medicinal Chemistry.—New York: Academic Press, 1975, pp. 10, 51.
175. Winek C. L. Clin. Chem., 22, 832 (1976).
176. Jewitt D. E., Kishon Y., Thomas M. Lancet, i, 266 (1968).
177. Gianelly R., van der Groeben J. O., Spivak A. P., Harrison D. C. N. Engl. J. Med., 277, 1215 (1967).
178. Nation R. L., Triggs E. J., Selig M. J. Chromatogr., 116, 188 (1976).
179. Svinhufvud G., Ortengren B., Jacobsson S. E. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 162 (1965).
180. Kennaghan J. B. Anesthesiology, 29, 110 (1968).
181. Reynolds F., Beckett A. H. J. Pharm. Pharmacol., 20, 704 (1968).
182. Rowland M., Thomson P. D., Guichard A., Melman K. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 179, 383 (1971).
183. Benowitz N., Rowland M. Anesthesiology, 39, 639 (1973).
184. DiFazio C. A., Brown R. E. Anesthesiology, 34, 86 (1971).
185. Kennaghan J. B., Boyes R. N. Anesthesiology, 34, 110 (1971).
186. Strong J. M., Atkinson A. J. Anal. Chem., 44, 2287 (1972).
187. Strong J. M., Parker M., Atkinson A. J. Clin. Pharmacol. Ther., 14, 67 (1973).
188. Adjepon-Yamoaah K. K., Prescott L. F. J. Pharm. Pharmacol., 26, 889 (1974).
189. Koch-Weser J. N. Engl. J. Med., 287, 227 (1972).
190. Simons K. J., Levy R. H. J. Pharm. Sci., 64, 1967 (1975).
191. Howe R., Shanks R. G. Nature (London), 210, 1336 (1966).
192. Barrett A. M., Cullum V. A. Brit. J. Pharmacol., 34, 43 (1968).
193. Fitzgerald J. D. Clin. Pharmacol. Ther., 10, 282 (1969).
194. George C. F., Fenyvesi T., Conolly M. E., Dollery C. T. Eur. J. Clin. Pharmacol., 4, 74 (1972).
195. Nies A. S., Evans G. H., Shand D. G. J. Pharmacol. Exp. Ther., 184, 716 (1973).
196. Caccia S., Guiso G., Ballabio M., DePonte P. J. Chromatogr., 172, 457 (1979).

197. Halpern B., Westley J. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 361 (1965).
198. Gordis E. *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 2124 (1966).
199. Caccia S., Jori A. J. *Chromatogr.*, **144**, 127 (1977).
200. Souter R. W. J. *Chromatogr.*, **108**, 265 (1975).
201. Beckett A. H., Testa B. J. *Pharm. Pharmacol.*, **25**, 382 (1973).
202. Caccia S., Chiabrando C., DePonte P., Fanelli R. J. *Chromatogr. Sci.*, **16**, 543 (1978).
203. DeSager J. P., Harvengt C. J. *Pharm. Pharmacol.*, **27**, 52 (1975).
204. Gallery E. D. M., Saunders D. M., Hunyor S. N., Gyory A. Z. *Med. J. Aust.*, **1**, 540 (1978).
205. Tsuei S. E., Thomas J., Moore R. G. J. *Chromatogr.*, **181**, 135 (1980).
206. Jack D. B., Riess W. J. *Chromatogr.*, **88**, 173 (1974).
207. Degen P. H., Riess W. J. *Chromatogr.*, **121**, 72 (1976).
208. Walle T. J. *Pharm. Sci.*, **63**, 1885 (1974).
209. Huber J. F. K. (Editor). *Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography*, J. Chromatogr. Library Series, Vol. 13. — Amsterdam: Elsevier, 1981.
210. Snyder L. R., Kirkland J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Edn. — New York: Wiley-Interscience, 1979.
211. Walton H. F. *Anal. Chem.*, **52**, 15R (1980).
212. Amin M., Schneider P. W. *Analyst (London)*, **103**, 728 (1978).
213. Amin M., Schneider P. W. *Analyst (London)*, **103**, 1076 (1978).
214. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss F. W. J. *Chromatogr.*, **222**, 13 (1981).
215. Twitchett P. J., Moffat A. C. J. *Chromatogr.*, **111**, 149 (1975).
216. Yost Y., Stoveken J., MacLean W. J. *Chromatogr.*, **134**, 73 (1977).
217. Schroeder R. R., Kudirka P. J., Toren E. C., Jr. J. *Chromatogr.*, **134**, 83 (1977).
218. Kabra P. M., Stafford B. E., Morton L. J. *Clin. Chem.*, **23**, 1284 (1977).
219. Evans J. E. *Anal. Chem.*, **45**, 2428 (1973).
220. Atwell S., Green V., Haney W. J. *Pharm. Sci.*, **64**, 806 (1975).
221. Kabra P. M., Gotetti G., Stanfill R., Marton L. J. *Clin. Chem.*, **22**, 824 (1976).
222. Kabra P. M., Marton L. J. *Clin. Chem.*, **22**, 1070 (1976).
223. Kitazawa S., Komura T. *Clin. Chim. Acta*, **73**, 31 (1976).
224. Gauchel G., Gauchel F. D., Birkofer L. Z. *Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **11**, 459 (1973).
225. Soldin S. J., Hill J. G. *Clin. Chem.*, **22**, 856 (1976).
226. Glazko A. J., Dill A. W. — In: *Antiepileptic Drugs*./Eds. Penry J. K., Schmidt R. P. — New York: Raven, 1972, p. 193.
227. Quattrone A. J., Putnam R. S. *Clin. Chem.*, **27**, 129 (1981).
228. Twitchett P. J., Moffat A. C. J. *Chromatogr.*, **111**, 149 (1975).
229. Jallow P. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **104**, 341 (1980).
230. Clark G. R., Chan J. *Anal. Chem.*, **50**, 635 (1978).
231. Proelss H. F., Lohman H. J., Miles D. G. *Clin. Chem.*, **24**, 1948 (1978).
232. Kraak J. C., Bijster P. J. *Chromatogr.*, **143**, 499 (1977).
233. Vandemark F. L., Adams R. F., Schmidt G. J. *Clin. Chem.*, **24**, 87 (1978).
234. Detaevernier M. R., Dryon L., Massart D. L. J. *Chromatogr.*, **128**, 204 (1976).
235. Godbillon J., Gauron S. J. *Chromatogr.*, **204**, 303 (1981).
236. Lagerstrom P. O., Carlsson I., Persson B. A. *Acta Pharm. Suecica*, **13**, 157 (1976).
237. Mellström B., Eksborg S. J. *Chromatogr.*, **116**, 475 (1976).
238. Mellström B., Tybring G. J. *Chromatogr.*, **143**, 597 (1977).
239. Lohmann H. J., Proelss H. F., Miles D. G. *Clin. Chem.*, **24**, 1006 (1978).

240. Persson B.-A., Lagerström P.-O. J. Chromatogr., **122**, 305 (1976).
241. Westenberg H. G. M., Drenth B. F. H., de Zeeuw R. A., de Cuyper H., van Praag H. M., Korf J. J. Chromatogr., **142**, 725 (1977).
242. van den Berg J. H. M., de Ruwe H. J. J. M., Deelder R. S., Plomp T. A. J. Chromatogr., **138**, 431 (1977).
243. Sutfin T. A., Jusko W. J. J. Pharm. Sci., **68**, 703 (1979).
244. Bonora A., Borea P. A. Experientia, **34**, 1486 (1978).
245. Watson I. D., Stewart M. J. J. Chromatogr., **134**, 182 (1977).
246. de Zeeuw R. A., Westenberg H. G. M. J. Anal. Toxicol., **2**, 229 (1978).
247. Kuss H. J., Nathmann M. Arzeim.-Forsch., **28**, 1301 (1978).
248. Uges D. R. A., Bouma P. Pharm. Weekbl. Sci. Ed., **1**, 417 (1979).
249. Vandemark F. L., Adams R. F., Schmidt G. J., Salvin W. Clin. Chem., **23**, 1139 (1977).
250. Bondo P. B., Thoma J. J., Beltz G. A. Clin. Chem., **25**, 1118 (1979).
251. Reece P. A., Zacest R., Barrow C. G. J. Chromatogr., **163**, 310 (1979).
252. Sivorinovsky G. Clin. Chem., **25**, 1144 (1979).
253. Hackett L. P., Duscil L. J. Clin. Toxicol., **15**, 55 (1979).
254. Peat M. A., Kopjak L. J. Forensic. Sci., **24**, 46 (1979).
255. Harzer K., Barchet R. J. Chromatogr., **132**, 83 (1977).
256. Vree T. B., Lenselink B., van der Kleijn E., Nijhuis G. M. M. J. Chromatogr., **143**, 530 (1977).
257. Vree T. B., Baars A. M., Hekster Y. A., van der Kleijn E., O'Reilly W. J. J. Chromatogr., **162**, 605 (1979).
258. Brodie R. R., Chasseaud L. F., Taylor T. J. Chromatogr., **150**, 361 (1978).
259. Kabra P. M., Stevens G. L., Marton L. J. J. Chromatogr., **150**, 355 (1978).
260. Tjaden U. R., Meeles M. T. H. A., Thys C. P., van der Kaay M. J. Chromatogr., **181**, 227 (1980).
261. Collier S., Publisi C. V., Gustafson J. H. J. Chromatogr., **222**, 95 (1981).
262. Perchalski R. J., Wilder B. J. Anal. Chem., **50**, 554 (1978).
263. Ascalone V. J. Chromatogr., **181**, 141 (1980).
264. Strojny N., Puglisi C. V., de Silva J. A. F. Anal. Lett., **B11(2)**, 135 (1978).
265. Peat M. A., Finkle B. S., Deyman M. E. J. Pharm. Sci., **68**, 1467 (1979).
266. Strojny N., Bratin K., Brooks M. A., de Silva J. A. F. J. Chromatogr., **143**, 363 (1977).
267. Greizerstein H. B., Wojtowicz C. Anal. Chem., **49**, 2235 (1977).
268. Zagar J. B., Vanlenten F. J., Chrekian G. P. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **61**, 678 (1978).
269. Scott C. G., Bommer P. J. Chromatogr., **8**, 446 (1970).
270. Weber D. J. J. Pharm. Sci., **61**, 1797 (1972).
271. Moore B., Nickless G., Hallet C., Howard A. G. J. Chromatogr., **137**, 215 (1977).
272. Vree T. B., Lenselink B., van der Kleijn E., Nijhuis G. M. M. J. Chromatogr., **143**, 530 (1977).
273. Wittwer J. D. J. Liquid Chromatogr., **3**, 1713 (1980).
274. Koch-Messer J., Klein S. W. J. Amer. Med. Ass., **215**, 1454 (1971).
275. Barnhardt F. E. — In: Methodology for Analytical Toxicology./Ed. Sunshine I. — OH, Cleveland: CRC Press, 1975.
276. Adams R. F., Vandemark F. L., Schmidt G. Clin. Chim. Acta, **69**, 515 (1976).
277. Smith D. J. J. Chromatogr. Sci., **19**, 253 (1981).
278. Vesell E. S., Passananti G. T. Clin. Chem., **17**, 851 (1971).
279. Esler M., Zweifel A., Rindall O., DeQuattro V. Clin. Pharmacol. Ther., **22**, 299 (1977).
280. Kornhausen D. M., Wood A. J. J., Vestal R. E., Wilkinson G. R., Branch R. A., Shend D. G. Clin. Pharmacol. Ther., **23**, 165 (1978).

281. *Nygard G., Shelver W. H., Khalil S. K. W. J. Pharm. Sci., 68, 379 (1979).*
282. *Nation R. L., Peng G. W., Chiou W. L., J. Chromatogr., 145, 429 (1979).*
283. *Castenada A. R., Bacaner M. B. Amer. J. Cardiol., 23, 107 (1969).*
284. *Lai C. M., Look Z. M., Lai P. K., Yacobi A. J. Liquid Chromatogr., 3, 93 (1980).*
285. *Johnson C. D., Revill J. P. Acta Pharmacol. Toxicol., 22, 112 (1965).*
286. *Duncombe W. G., McCoulrey A. Brit. J. Pharmacol., 15, 260 (1960).*
287. *Tompsett S. L., Forshall W., Smith D. C. Acta Pharmacol. Toxicol., 18, 75 (1961).*
288. *Kuntzman R., Tsai I., Chang R., Conney A. H. Clin. Pharmacol. Ther., 11, 829 (1970).*
289. *Koch-Weser J. Arch. Int. Med., 129, 763 (1972).*
290. *Pound N. J., Sears R. W. Can. J. Pharm. Sci., 10, 122 (1975).*
291. *Smith E., Barkan S., Ross B., Maienthal M., Levine J. J. Pharm. Sci., 62, 1151 (1973).*
292. *Carroll F. I., Philip A., Coleman M. C. Tetrahedron Lett., 1757 (1976).*
293. *Valentine J. L., Driscoll P., Hamburg E. L., Thompson E. D. J. Pharm. Sci., 65, 96 (1976).*
294. *Midha K. K., Charette C. J. Pharm. Sci., 63, 1244 (1974).*
295. *Sved S., McGilveray I. J., Beaudoin N. J. Chromatogr., 145, 437 (1978).*
296. *Armand J., Badinard A. Ann. Biol. Clin., 30, 599 (1972).*
297. *Yee Y.-G., Kates R. E. J. Chromatogr., 223, 454 (1981).*
298. *Patel B. R., Kirschbaum J. J., Poet R. B. J. Pharm. Sci., 70, 336 (1981).*
299. *Weddle O. H., Anrick E. N., Mason W. D. J. Pharm. Sci., 67, 1033 (1978).*
300. *Djerassi I., Farber S., Abir E., Neikirk W. Cancer, 20, 233 (1967).*
301. *Jaffe N., Frei E., Traggist D. N. Engl. J. Med., 291, 994 (1974).*
302. *Bleyer W. A. Cancer, 41, 36 (1978).*
303. *Chabner B. A., Myers C. E., Coleman C. N., Johns D. G. N. Engl. J. Med., 292, 1107 (1975).*
304. *Johns D. G., Bertino J. R. — In: Cancer Medicine./Eds. Holland J. F., Frei E. — PA, Philadelphia: Lea and Febiger, 1973, p. 739.*
305. *Cohen J. L., Hisayasu G. H., Barrientos A. R., Nayar M. S. B., Chan K. K. J. Chromatogr., 181, 478 (1980).*
306. *Werkheiser W. C., Zakrzewski S. F., Nichol C. A. J. Pharmacol. Exp. Ther., 137, 162 (1972).*
307. *Wang Y. M., Lantin E., Sutow W. W. Clin. Chem., 22, 1053 (1976).*
308. *Myers C. E., Lippman M. E., Elliot H. M., Chabner B. A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 72, 3683 (1975).*
309. *Raso V., Schreiber R. Cancer Res., 35, 1407 (1975).*
310. *Bohoun C., Dubrey F., Bondene C. Clin. Chim. Acta, 57, 263 (1974).*
311. *Chakrabarti S. G., Bernstein J. A. Clin. Chem., 15, 1157 (1969).*
312. *Kincad M. M., Vogle W. R., Dayton P. G. Biochem. Med., 10, 337 (1974).*
313. *Nelson J. A., Harris B. A., Decker W. J., Farquhar D. Cancer Res., 37, 3970 (1977).*
314. *Watson E., Cohen J. L., Chan K. K. Cancer Treat. Rep., 62, 381 (1978).*
315. *Isacoff W. H., Morrison P. F., Aroesty J., Willis K. L., Block J. B., Lincoln T. L. Cancer Treat. Rep., 61, 1655 (1977).*
316. *Azarnoff D. L., Wan S. H., Huffman D. H. Clin. Pharmacol. Ther., 16, 884 (1974).*
317. *Jacobs S. A., Stoller R. G., Chabner B. A., Johns D. G. Cancer Treat. Rep., 61, 651 (1977).*
318. *Nelson J. A., Harris B. A., Decker W. J., Farguha D. Cancer Res., 37, 3970 (1977).*
319. *Lankelma J., van der Kleijn E., Ramaekers F. Cancer Lett., 9, 133 (1980).*
320. *Lawson G. J., Dixon P. F., Aherne G. W. J. Chromatogr., 223, 225 (1981).*

321. *Gale R. P.* N. Engl. J. Med., **300**, 1189 (1979).
322. *Ho D. H. W., Frei E.* Clin. Pharmacol. Ther., **12**, 944 (1971).
323. *Wan S. H., Huffjan D. H., Azarnoff D. L., Hoogstraten B., Larsen W. E.* Cancer Res., **34**, 392 (1974).
324. *Mompalier R. L., Labitan A., Rossi M.* Cancer Res., **32**, 408 (1972).
325. *Harris A. L., Potter C., Bunch C., Boutagy J., Harvey D. L., Garham-Smith D. G.* Brit. J. Clin. Pharmacol., **8**, 219 (1979).
326. *Piall E. M., Aherne G. W., Marks V. M.* Brit. J. Cancer., **40**, 548 (1979).
327. *Boutagy J., Harvey D. J. J.* Chromatogr., **146**, 283 (1978).
328. *Rustum Y. M.* Anal. Biochem., **90**, 289 (1978).
329. *Bury R. W., Keary P. J. J.* Chromatogr., **146**, 350 (1978).
330. *Pallavicini M. G., Mazrimas J. A. J.* Chromatogr., **183**, 449 (1980).
331. *Linssen P., Drenthe-Schonk A., Wessels H., Haanen C. J.* Chromatogr., **223**, 371 (1981).
332. *Livingston R. B., Carter S. K.* Single Abents in Cancer Chemotherapy. — New York: Plenum, 1970, p. 99.
333. *Clarkson B.* — In: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents./Eds. Sartorelli A. C., Johns D. G. — New York: Springer, 1974, p. 172.
334. *Goras J. T., Knight J. B., Iwamoto R. H., Lim P. J.* Pharm. Sci., **59**, 561 (1970).
335. *Chang S. Y., Alberts D. S., Melnick L. R., Watsson P. D., Salmon S. E. J.* Pharm. Sci., **67**, 679 (1978).
336. *Chang S. Y., Evans T. L., Alberts D. S., Sipes I. G.* Life Sci., **23**, 1697 (1978).
337. *Furner R. L., Mellet L. B., Brown R. K., Duncan G.* Drug Metab. Dis., **4**, 577 (1976).
338. *Ahmed A. E., Hsu T.-F. J.* Chromatogr., **222**, 453 (1981).
339. *Fandrich S. E., Pittman K. A. J.* Chromatogr., **223**, 155 (1981).
340. *Strojny N., D'Arconte L., de Silva J. A. F. J.* Chromatogr., **223**, 111 (1981).
341. *Mohammed Y. H., Cantwell F. F.* Anal. Chem., **50**, 491 (1978).
342. *Muhammad N., Bodnar J. A. J.* Liquid Chromatogr., **3**, 113 (1980).
343. *Massart D. L., Detaevernier M. R. J.* Chromatogr. Sci., **18**, 139 (1980).
344. *Moffat A. C., Smalldon K. W. J.* Chromatogr., **90**, 9 (1974).
345. *Moffat A. C., Clare B. J.* Pharm. Pharmacol., **26**, 665 (1974).
346. *Ascione P. P., Chrekian G. P. J.* Pharm. Sci., **64**, 1029 (1975).
347. *Peng G. W., Gadalla M. A. F., Smith V., Peng A., Chiou W. L. J.* Pharm. Sci., **67**, 710 (1978).
348. *Bundgaard H.* Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed., **4**, 103 (1976).
349. *Jansson S. O., Andersson I.* Acta Pharm. Suecica, **14**, 161 (1977).
350. *Stevenson R. L., Burtis C. A. J.* Chromatogr., **61**, 253 (1971).
351. *Baum R. G., Cantwell F. F.* Anal. Chem., **50**, 280 (1978).
352. *Baum R. G., Cantwell F. F. J.* Pharm. Sci., **67**, 710 (1978).
353. *Reedmeier J. F., Kirchhoefer R. D. J.* Pharm. Sci., **68**, 1167 (1979).
354. *Taguchi V. Y., Cotton M. L., Yates C. H., Millar J. F. J.* Pharm. Sci., **70**, 64 (1981).
355. *Honigberg I. L., Stewart J. T., Smith M. J.* Pharm. Sci., **67**, 675 (1978).
356. *Snyder R. J.* Chromatogr., **92**, 223 (1974).
357. *Eppel M. L., Oliver J. S., Smith H., Mackay A., Ramsay L. E.* Analyst (London), **103**, 1061 (1978).
358. *Shah V. P., Riegelman S. J.* Pharm. Sci., **63**, 1283 (1974).
359. *Johnson G. F., Dechtiaruk W. A., Solomon H. M.* Clin. Chem., **21**, 144 (1975).
360. *Least C. J., Jr., Johnson G. F., Solomon H. M.* Clin. Chem., **22**, 765 (1976).
361. *Adams R. F., Vandemark F. L., Schmidt G. J.* Clin. Chem., **22**, 1903 (1976).

362. *Franconi L. C., Hawk G. L., Sandmann B. J., Haney W. G.* Anal. Chem., **48**, 372 (1976).
363. *Peat M. A., Jennison T. A.* J. Anal. Toxicol., **1**, 204 (1977).
364. *Kram T. C.* J. Pharm. Sci., **71**, 254 (1972).
365. *Poet R. B., Pu H. H.* J. Pharm. Sci., **72**, 809 (1973).
366. *Su S. C., Hartkopf A. V., Karger B. L.* J. Chromatogr., **119**, 523 (1976).
367. *Waters Associates, Inc., Antibiotics — Sulfa Drugs, Application Rept. No. 10.* — MA, Milford: Waters Assoc., 1979.
368. *Suber R. L., Edds G. I.* J. Liquid Chromatogr., **3**, 257 (1980).
369. *Vilim A. B., Larocque L., Macintosh A. I.* J. Liquid Chromatogr., **3**, 1725 (1980).
370. *Goodspeed D. P., Simpson R. M., Ashwort R. B., Shafer J. W., Cook H. R.* J. Ass. Offic. Anal. Chem., **61**, 1050 (1978).
371. *Johnson K. L., Jeter D. T., Claiborne R. C.* J. Pharm. Sci., **64**, 1657 (1975).
372. *Bratton A. C., Marshall E. K.* J. Biol. Chem., **128**, 537 (1939).
373. *De Leenheer A. P., Roncucci R. R., van Peteghem C.* (Editors), Quantitative Mass Spectrometry in Life Science II. — Amsterdam: Elsevier, 1978.
374. *Frigerio A., McCamish M.* (Editors), Recent Development in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, 6. — Amsterdam: Elsevier, 1980.
375. *Millard B. J.* Quantitative Mass Spectrometry. — London: Heyden, 1978.
376. *ten Noever de Brauw M. C.* J. Chromatogr., **165**, 207 (1979).
377. *Burlingame A. L., Baillie T. A., Derrick P. J., Chizhov O. S.* Anal. Chem., **52**, 220R (1980).
378. *Smith R. M.* Amer. Lab., **10**, 53 (1978).
379. *Horning E. C., Carroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N., Thenot J. P.* J. Ass. Offic. Anal. Chem., **61**, 1232 (1978).
380. *Tatematsu A., Yoshizumi H., Nadai T., Kubodera T., Asai S.* Biomed. Mass Spectrom., **5**, 192 (1978).
381. *Gram L. F.* Clin. Pharmacokinetics, **2**, 237 (1977).
382. *Frigerio A., Belvedere G., De Nadai F., Fanelli R., Pantarotto C., Riva E., Morselli P. L.* J. Chromatogr., **74**, 201 (1972).
383. *Belvedere G., Burti L., Frigerio A., Pantarotto C.* J. Chromatogr., **111**, 313 (1975).
384. *Biggs J. L., Holland W. H., Chang S. S., Hipps P. P., Sherman W. R.* J. Pharm. Sci., **65**, 261 (1976).
385. *Dubois J. P., Kung W., Theobald W., Wirz B.* Clin. Chem., **22**, 892 (1976).
386. *Claeys M., Muscettola G., Markey S. P.* Biomed. Mass Spectrom., **3**, 110 (1976).
387. *Alfredsson G., Wiesel F. A., Fryo B., Sedvall G.* Psychopharmacology, **52**, 25 (1977).
388. *Alkalay D., Volk J., Carlsen S.* Biomed. Mass Spectrom., **6**, 200 (1979).
389. *Garland W. A., Muccino R. R., Min B. H., Cupano J., Fann W. E.* Clin. Pharmacol. Ther., **25**, 844 (1979).
390. *Hammar C. G., Alexanderson B., Holmstedt B., Sjöquist F.* Clin. Pharmacol. Ther., **12**, 496 (1971).
391. *Wilson J. M., Williamson L. J., Raisys V. A.* Clin. Chem., **23**, 1012 (1977).
392. *Zeigler V. E., Taylor J. R.* Clin. Pharmacol. Ther., **19**, 795 (1976).
393. *Zeigler V. E., Clayton P. J., Taylor J. R.* Clin. Pharmacol. Ther., **20**, 458 (1976).
394. *Heck H. A., Flynn N. W., Buttrill S. E., Jr., Dyer R. L., Anbar M.* Biomed. Mass Spectrom., **5**, 250 (1978).
395. *Wretling M., Pilbrant A., Sundwall A., Vessman J.* Acta Pharmacol. Toxicol., **40** (Suppl. 1), 28 (1977).
396. *Marcucci F., Bianchi R., Airoidi L., Salmona M., Fanelli R., Chiabrando C., Frigerio A., Mussini E., Garattini S.* J. Chromatogr., **107**, 285 (1975).
397. *Sadee W., van der Kleijn E.* J. Pharm. Sci., **60**, 135 (1971).

398. *Lanzoni J., Airoidi L., Marcucci F., Mussini E. J. Chromatogr.*, **168**, 260 (1979).
399. *Schillings R. T., Shrader S. R., Ruelius H. W. Arzneim-Forsch.*, **21**, 1059 (1971).
400. *Min B. H., Garland W. A. J. Chromatogr.*, **139**, 121 (1977).
401. *Garland W. A., Min B. H. J. Chromatogr.*, **172**, 279 (1979).
402. *Clatworthy A. J., Jones L. V., Whitehouse M. J. Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 248 (1977).
403. *Grove J. J. Chromatogr.*, **59**, 289 (1971).
404. *Prescott L. F. J. Pharm. Pharmacol.*, **23**, 111 (1971).
405. *Thomas B. H., Coldwell B. B. J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 243 (1972).
406. *Garland W. A., Hsiao K. C., Pantuck E. J., Conney A. H. J. Pharm. Sci.*, **66**, 340 (1977).
407. *Baty J. D., Robinson P. R., Wharton J. Biomed. Mass Spectrom.*, **3**, 60 (1976).
408. *Zweig G., Sherma J. Anal. Chem.*, **52**, 276R (1980).
409. *Gonnet C., Marichy M. J. Liquid Chromatogr.*, **3**, 1901 (1980).
410. *Aszalos A. J. Liquid Chromatogr.*, **3**, 867 (1980).
411. *Auterhoff H. Thin-Layer Chromatograms and IR Spectra Identification of Drugs. 3rd Edn. — Stuttgart: Wissenschaftliche-Verlagsgesellschaft, 1977.*
412. *Macek K. (Editor), Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography. — Amsterdam: Elsevier, 1972.*
413. *Massart D. L., de Clercq H. Anal. Chem.*, **46**, 1988 (1974).
414. *Massart D. L. J. Chromatogr.*, **79**, 157 (1973).
415. *Massart D. L., Sruits R. Anal. Chem.*, **46**, 281 (1974).
416. *de Clercq H., Massart D. L. J. Chromatogr.*, **115**, 1 (1975).
417. *Moffat A. C., Smalldon K. W., Brown C. J. Chromatogr.*, **90**, 1 (1974).
418. *Moffat A. C., Smalldon K. W. J. Chromatogr.*, **90**, 9 (1974).
419. *Moffat A. C., Clare B. J. Pharm. Pharmacol.*, **26**, 665 (1974).
420. *Moffat A. C. J. Chromatogr.*, **110**, 341 (1975).
421. *Clark E. G. C. Isolation and Identification of Drugs. — London: Pharmaceutical Press, 1969, p. 43.*
422. *Sunnshine I. Handbook of Analytical Toxicology. — OH, Cleveland: CRC, 1969.*
423. *Jackson J. V., Clatworthy A. J. — In: Chromatographic and Electrophoretic Techniques./Eds. Smith I., Seakins J. W. T., Vol. 1. — London: Heinemann, 1976, p. 380.*
424. *Davidow B., Li Petri N., Quame B. Amer. J. Clin. Pathol.*, **50**, 714 (1969).
425. *Mulé S. J. J. Chromatogr.*, **39**, 302 (1969).
426. *Kaistha K. K., Jaffe J. H. J. Pharm. Sci.*, **61**, 679 (1972).
427. *Cochin J. Psychopharm. Bull.*, **3**, 53 (1966).
428. *de Zeeuw R. A., Feitsma M. T. Pharm. Weekbl.*, **101**, 957 (1966).
429. *Rosenthal W. A., Kaser M. M., Milewski K. N. Clin. Chim. Acta*, **33**, 51 (1971).
430. *Jain N. C., Cravey R. H. J. Chromatogr.*, **12**, 228 (1974).
431. *Pranitis P. A. F., Stolman A. J. Chromatogr.*, **106**, 485 (1975).
432. *Smith P. J., Herman T. S. Anal. Biochem.*, **22**, 134 (1968).
433. *Sohn D., Simon J., Hanna M. A., Ghali G., Tolba R. J. Chromatogr.*, **87**, 570 (1973).
434. *Owen P., Pendlebury A., Moffat A. C. J. Chromatogr.*, **161**, 187 (1978).
435. *Clifford J. M., Smyth W. F. Analyst (London)*, **99**, 241 (1975).
436. *Hailey D. M. J. Chromatogr.*, **98**, 527 (1974).
437. *Gupta R. C., Kofoed J. Nature (London)*, **198**, 384 (1963).
438. *Ebel S., Holtz H., Lerche H. Deut. Apoth.-Ztg.*, **108**, 779 (1968).
439. *Bush M. T. Microchem. J.*, **5**, 73 (1961).
440. *Ioannides C., Chakraborty J., Parke D. V. Chromatographia*, **7**, 351 (1974).
441. *Larebau S., Saux M. C. J. Eur. Toxicol.*, **6**, 139 (1963).

442. Weissman N., Lowe M., Beattie J. M., Demetriou J. A. Clin. Chem., **17**, 875 (1971).
443. Rosenthal W. A., Kaser M. M., Milewski K. N. Clin. Chim. Acta, **33**, 51 (1971).
444. Iliaba K., Crawhall J. C., Sin C. M. Clin. Biochem., **3**, 287 (1970).
445. Kreysing G., Frahm M. Deut. Apoth.-Ztg., **110**, 1133 (1970).
446. Goenechea S. J. Chromatogr., **40**, 182 (1969).
447. Melzacka M., Kahl W. Chem. Anal. Warsaw., **14**, 453 (1969).
448. Amal H., Tulus S., Sanli L. Istanbul Univ. Eczacilik Fak. Mecm., **4**, 23 (1968).
449. Curry A. S., Fox R. H. Analyst (London), **93**, 834 (1968).
450. Machata G. Mikrochim. Acta, **1**, 79 (1960).
451. Machata G., Battista H. J. Chromatographia, **104** (1968).
452. Sohn D. Пат. СССР 832134; С. А., **81**, 164454z (1974).
453. Hishida S., Ueda M., Tanabe T., Mizoi Y., Kobe J. Med. Sci., Tokyo, **18**, 1 (1972).
454. Kenison L. T., Loveridge E. L., Gronlund J. A., Elmowafi A. A. J. Chromatogr., **71**, 165 (1972).
455. de Zeeuw R. A., Wijsbeek J. Pharm. Weekbl., **104**, 901 (1969).
456. Kammerl E., Mutschler E. Pharm. Ind., **35**, 146 (1973).
457. Wang R. I. H., Mueller M. A. J. Pharm. Sci., **62**, 2047 (1973).
458. Garceau Y., Philopoulos Y., Hasegawa J. J. Pharm. Sci., **62**, 2032 (1973).
459. Abu-Eitlah R., Osman A., El-Behare A. Analyst (London), **103**, 1083 (1978).
460. Kaistha K. K., Tadrus R., Janda R. J. Chromatogr., **107**, 359 (1975).
461. Guerrant G. O., Hall C. T. Clin. Toxicol., **10**, 209 (1977).
462. Wallace J. E., Blum K., Singh J. B. Clin. Toxicol., **7**, 477 (1974).
463. Decker W. J. Clin. Toxicol., **10**, 23 (1977).
464. Mulé S. J. J. Chromatogr., **55**, 255 (1971).
465. Dole V. P., Kim W., Eglitis I. J. Amer. Med. Ass., **198**, 349 (1966).
466. Mulé S. J., Bastos M. L., Jukofsky D., Saffer E. J. Chromatogr., **63**, 289 (1972).
467. Fujimoto J. M., Wang R. I. H. Toxicol. Appl. Pharmacol., **16**, 186 (1970).
468. Wallace J. E., Biggs J. D., Merritt J. H., Hamilton H. E., Blum K. J. Chromatogr., **71**, 135 (1972).
469. Kaistha K. K. J. Pharm. Sci., **61**, 655 (1972).
470. Kaistha K. K., Jaffe J. H. J. Chromatogr., **60**, 83 (1971).
471. Kaistha K. K., Jaffe J. H. J. Pharm. Sci., **61**, 679 (1972).
472. Anderson J. Practitioner, **212**, 536 (1934).
473. Ladewig D., Battagay R. Int. J. Addict., **6**, 167 (1971).
474. Levin A. Postgrad Med. J., **51**, Suppl. 1, 186 (1975).
475. Oswald I. Brit. Med. J., **3**, 67 (1971).
476. Whitlock F. A., Nadorfi M. I. Med. J. Aust., **2**, 1097 (1970).
477. Winek C. L., Kuhlman J. J., Jr., Shanor S. P. Clin. Toxicol., **17**, 337 (1980).
478. Rubia L. B., Gomez R. J. Pharm. Sci., **66**, 1656 (1977).
479. Christiansen J. J. Chromatogr., **123**, 57 (1976).
480. Wesley-Hadzija B., Mattocks A. M. J. Chromatogr., **143**, 307 (1977).
481. Steyn J. M. J. Chromatogr., **120**, 465 (1976).
482. Abou-Donia M. B., Bakry N. M., Strauss H. C. J. Chromatogr., **172**, 463 (1979).
483. Lepri L., Desideri P. G., Heimler D. J. Chromatogr., **153**, 77 (1978).
484. Lepri L., Desideri P. G., Heimler D. J. Chromatogr., **155**, 119 (1978).
485. Lepri L., Desideri P. G., Heimler D. J. Chromatogr., **169**, 271 (1979).
486. Lee K. Y., Nurok D., Zlatkis A., Karmen A. J. Chromatogr., **158**, 403 (1978).
487. Gonnet C., Marichy M. J. Liquid Chromatogr., **3**, 1901 (1980).

Глава 9

Антибиотики

Дж. Г. Вагман, М. Дж. Вейнстейн

9.1. Введение

Эра антибиотиков, начавшаяся в 40-х годах с микробиологического получения пенициллина и его использования в качестве химиотерапевтического препарата, в последние годы ознаменовалась необычайным увеличением объема производства этих микробных метаболитов. Среди множества существующих определений термина «антибиотик» наиболее употребительным является, по-видимому, следующее: антибиотик — это вещество микробного происхождения, которое способно при небольших концентрациях ингибировать рост микроорганизмов*. Продуценты таких веществ широко распространены в природе, причем вырабатываемые ими антибиотики заметно различаются по химическим свойствам, механизму действия, а также по спектру антимикробной активности. Таким образом, несмотря на то что существует целый ряд групп родственных антибиотиков, сами по себе эти соединения имеют весьма отдаленное сходство друг с другом.

Для того чтобы можно было следить за ходом выделения и очистки антибиотиков, разработаны многочисленные методы обнаружения и идентификации этих веществ, основанные главным образом на использовании различных хроматографических методов. Первоначально, когда число известных антибиотиков было еще сравнительно мало, для этой цели были вполне пригодны простые методы бумажной хроматографии. К настоящему времени открыты уже тысячи антибиотиков, и их число продолжает неуклонно расти благодаря получению новых, более эффективных препаратов из природных антибиотиков путем их моди-

* Поскольку к антибиотикам относятся также антибактериальные вещества, извлекаемые из растительных и животных клеток, более удачным представляется определение, предложенное Шемякиным и др. (Шемякин М. М., Хохлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К. Химия антибиотиков. — М. 1961). Согласно этому определению, антибиотиками следует называть продукты обмена любых организмов, способные избирательно убивать микроорганизмы (бактерии, грибы и др.) или подавлять их рост. — *Прим. перев.*

фикации с помощью химических и микробиологических методов. Согласно оценке Перлмана, приведенной в предисловии к книге [1], за период с 1947 по 1977 год получено более 50 000 полусинтетических антибиотиков, причем большая их часть — за последние 18 лет, однако лишь очень немногие из этих соединений нашли реальное применение в клинической медицине. Поэтому продолжают поиски природных антибиотиков, которые могут быть использованы как таковые либо в виде производных, обладающих более высокой активностью и (или) более низкой токсичностью.

К счастью, весьма часто антибиотики можно обнаружить непосредственно в культуральных средах, причем в отличие от многих других соединений для их идентификации хроматографическими методами бывает достаточно незначительных количеств вещества и эта процедура не сопряжена с трудоемким выделением и очисткой препарата. Многие из недавно описанных ВЭЖХ-методов вполне пригодны для выделения небольших количеств чистых антибиотиков. Хроматография является важным вспомогательным средством, позволяющим убедиться в справедливости закона Мерфи, который гласит, что антибиотик, продуцируемый в сложной смеси в наименьших количествах, обычно наиболее интересен. В этой главе мы не будем углубляться в вопросы, касающиеся препаративной хроматографии, а ограничимся лишь описанием методологии идентификации антибиотиков.

9.2. Хроматографические методы идентификации антибиотиков

Для идентификации антибиотиков и их отнесения к той или иной группе антибактериальных препаратов служит ряд хроматографических методов. До недавнего времени наиболее распространенным методом была бумажная хроматография (восходящая, нисходящая, круговая, центрифужная, одно- и двумерная бумажная хроматография, хроматография на бумаге, пропитанной буферами [2], на ионообменной бумаге [3] и т. п.), однако впоследствии широкое распространение получила также ТСХ (преимущественно на силикагеле или на оксиде алюминия), отличающаяся простотой аппаратного оформления и высокой скоростью анализа [4—9]. Чтобы придать сорбенту определенные свойства, его можно предварительно обработать соответствующим реагентом. Например, для разделения тетрациклинов, способных образовывать хелаты, Нишимото и др. [10] использовали пластинки с силикагелем, пропитанным раствором динатриевой соли ЭДТА. Известны примеры хроматографического

анализа антибиотиков на пластинках с целлюлозой [4, 11], сефадексом [12] и активным углем [13].

Для идентификации многих антибиотиков можно использовать также электрофорез [14—17] и противоточное распределение [18—20]. Что же касается разделения и идентификации антибиотиков с помощью ГЖХ [21—24], то в последние годы этот метод в значительной степени заменен на ВЭЖХ, основные преимущества которой заключаются в том, что она обеспечивает высокую скорость и эффективность разделения и детектирование элюата не сопряжено с разрушением компонентов анализируемой смеси. Вместе с тем ВЭЖХ не лишена и некоторых недостатков: во-первых, при переходе от одного антибиотика к другому часто бывает необходимо менять систему растворителей и режим детектирования, и, во-вторых, ВЭЖХ в отличие от бумажной и тонкослойной хроматографии не позволяет одновременно анализировать несколько смесей.

Лишь для небольшого числа из тысяч известных антибиотиков разработаны системы классификации и идентификации. В работе [25] на основании данных ТСХ и биоавтографии предложена классификация 151 антибиотика, обладающего противоопухолевой активностью; в работах [26, 27] для классификации 91 антибиотика использован метод «мгновенной ТСХ», а в работе [28] рассмотрены вопросы, связанные с применением ТСХ-систем для классификации и идентификации антибиотиков. Существуют два справочника по хроматографии антибиотиков [29, 30]. В «Руководстве по хроматографии» [31] приведены таблицы с данными по хроматографическим свойствам этих соединений. Описание ТСХ-методик можно найти в подробном обзоре Лотта и др. [32].

Методы обнаружения антибиотиков на протяжении ряда лет практически не претерпели никаких изменений. Обычно они включают биоавтографию с помощью чувствительных к данному антибиотику микроорганизмов, посеянных на агаре, или проявление хроматограмм путем их опрыскивания растворами соотвествующих реагентов с последующим просмотром при УФ-освещении. Для обнаружения антибиотиков наиболее пригоден метод биоавтографии, суть которого заключается в следующем. Высушенную бумажную хроматограмму, тонкослойную пластинку или электрофореграмму прижимают к поверхности агара, содержащего культуру подходящего микроорганизма, и выдерживают в течение определенного времени. За время инкубации число бактерий увеличивается лишь в тех участках агара, которые не соприкасались с антибиотиком. По положению зон, в которых подавляется рост бактерий, определяют значения R_f соединений, проявляющих свойства антибиотика. Мейерс и Чанг [33] предложили способ увеличения чувствительности обнару-

жения антибиотиков с помощью *Trichomonas*, основанный на использовании монофосфата фенолфталеина. Методология анализа специфических антибиотиков описана в работах, ссылки на которые приведены ниже. Разделы, посвященные обнаружению антибиотиков на хроматограммах, можно найти в книге [30], а также в соответствующих обзорах, содержащихся в двух предыдущих изданиях данной книги [34, 35].

9.3. Специфические методы

В соответствии с принадлежностью антибиотиков к той или иной группе этот раздел разбит на следующие подразделы: аминогликозиды, макролиды, пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины, полипептиды, полиеновые противогрибковые препараты и разнообразные соединения, обладающие свойствами антибиотиков. Очевидно, в рамках одной главы невозможно охватить весь необычно большой объем информации, поэтому здесь описаны наиболее современные хроматографические методы разделения и анализа некоторых важных антибиотиков, а также более старые основополагающие методы, которые до настоящего времени не утратили своего значения.

9.3.1. Аминогликозиды

Группа аминогликозидных антибиотиков, которая в действительности является группой аминоциклита, включает ряд семейств: гентамицины, неомицины, канамицины и стрептомицины, а также многочисленные менее известные соединения. Многие производные этих антибиотиков получены с помощью химических методов либо путем биосинтеза. Этот раздел посвящен только хроматографии наиболее важных или недавно обнаруженных природных и полусинтетических соединений. Наряду с этим описаны некоторые новые методики, используемые для характеристики давно известных антибиотиков.

Опубликовано множество методов разделения и идентификации компонентов гентамицина. Для разделения основных компонентов — C_1 , C_2 и C_{1a} — с помощью бумажной [36, 37] или тонкослойной [38, 39] хроматографии чаще всего используют смесь растворителей, представляющую собой нижний слой двухфазной системы хлороформ — метанол — 17%-ный водный раствор гидроксида аммония (2:1:1). Бумажную хроматографию используют также для оценки относительных количеств гентамицинов в смеси [40, 41]. К числу других аналогичных систем растворителей для бумажной хроматографии гентамицинов относятся смеси хлороформ — метанол — аммиак различного состава [37, 42] и бутанон-2 — *трет*-бутанол — метанол — концентри-

рованный гидроксид аммония (16:3:1:6) [37]. Система, описанная в работе [42], пригодна для разделения других родственных антибиотиков, например минорных компонентов гентамицина: гентаминов и сисомицина. Описан ряд ТСХ-методик для разделения гентамицинов на пластинках с силикагелем в аналогичных системах растворителей [38, 39, 43, 44]. Для разделения компонентов А, А₁, В, В₁ и Х была использована восходящая хроматография на пластинках Chrom AR Sheet 500 в системе, представляющей собой более тяжелую фазу смеси хлороформ — метанол — концентрированный гидроксид аммония (1:1:1) [41]. Эти компоненты можно разделить с помощью ТСХ в двух растворителях [42]. Благодаря наличию ионогенных групп гентамицин С₁ мигрирует в условиях электрофореза на бумаге [45, 46]. С-компоненты можно разделить с помощью противоточного распределения в системе хлороформ — метанол — аммиак [47], а также с помощью методов ВЭЖХ [48, 49]. ТСХ на силикагеле была использована для идентификации амикацина [50] и фортимицинов А и В [51]. Фортимицины разделяли также с помощью бумажной хроматографии в системе хлороформ — метанол — 17%-ный водный аммиак [51], а фортимицин А охарактеризован по своей подвижности в четырех системах растворителей [39].

Для разделения канамицинов были использованы методы бумажной хроматографии [39, 52—55], ТСХ [39, 54], электрофореза [56], ГЖХ [57] и ВЭЖХ [58]. Производные канамицина и его биосинтетические продукты были разделены с помощью бумажной хроматографии [59, 60] и ТСХ [60—63]. Для разделения компонентов неомицина и его N-ацетилпроизводных были применены разнообразные системы бумажной хроматографии [39, 60, 64—75]. Для этой же цели пригодны тонкослойные пластинки с силикагелем [75—79], углем [80], оксидом алюминия [81, 82], целлюлозой MN-300 [76, 83] и с кизельгуром [76]. Электрофоретическое разделение неомицинов осуществлено на ацетате целлюлозы [84, 85], на бумаге ватман № 3 ММ [46] и в полиакриламидном геле [86]. Описан также газохроматографический анализ неомицинов [87, 88].

Сисомицин — антибиотик, сравнительно недавно введенный в медицинскую практику, — был отделен от гентамицинов с помощью бумажной хроматографии [37, 89—91]. Для идентификации сисомицина была использована ТСХ на пластинках с силикагелем в трех системах растворителей [51]. В условиях ВЭЖХ этот антибиотик обнаруживают в виде флуоресцентного производного, образующегося при обработке элюата о-фталевым альдегидом [48]. Стрептомицин был отделен от маннзидострептомицина, диоксистрептомицина и оксистрептомицина с помощью бумажной хроматографии [92, 93], а с помощью ТСХ —

от дигидрострептомицина и дигидродезоксистрептомицина [54, 94—96]. Осуществлено также электрофоретическое разделение стрептомицина и его производных на бумаге ватман № 4 в шести различных буферах при напряжении 350 В и продолжительности электрофореза 1—4 ч [56]. Тобрамицин, первоначально идентифицированный как фактор 6 небрамицина, охарактеризован с помощью бумажной хроматографии в различных растворителях [39, 51] и с помощью ТСХ на силикагеле в трех системах растворителей [39].

Для идентификации аминогликозидов G-418 и G-52 использована бумажная хроматография в системе бутанол-2 — трет-бутанол — метанол — концентрированный гидроксид аммония (16:3:1:6) [97]; G-52 и вердамицин охарактеризованы с помощью бумажной хроматографии в шести системах растворителей [92]. Паромомицины и их производные хроматографировали на бумаге [92—99], а также на тонкослойных пластинках с оксидом алюминия, целлюлозой [98, 99] и силикагелем [100, 101]. N-Ацетилпроизводные паромомицинов I и II с охарактеризованы с помощью бумажной хроматографии в системе бутанол-1 — пиридин — вода (6:4:3) [60]. Для идентификации бутирозинов использованы различные системы бумажной хроматографии [39, 102, 103] и ТСХ [39, 104]. Производные бутирозинов разделены с помощью ТСХ в пяти системах растворителей [105]. Нетильмицин — новый полусинтетический аминогликозид — охарактеризован с помощью ВЭЖХ [48, 106]. Два метода бумажной хроматографии использованы для идентификации рибостамицина [51, 74], а для разделения серии его полусинтетических производных применена дополнительная система [107]. Описано также несколько методов ТСХ этих соединений, в том числе на силикагеле и целлюлозе [51, 54, 108].

9.3.2. Макролиды

Из множества макролидов нами выбрана для обсуждения ограниченная группа антибиотиков. Многие другие аналогичные соединения можно разделить с помощью таких же методов.

Смеси, содержащие эритромицин и карбомицин (магнамицин) [109, 110], а также компоненты эритромицина и их производные были разделены с помощью бумажной хроматографии [111—113] и ТСХ [114—119]. Электрофоретическая подвижность компонентов эритромицина на бумаге в боратном буфере уменьшается в ряду $B > A > C$ [114]. Компонент В был выделен с помощью противоточного распределения [111], а компоненты А и В разделены с помощью ВЭЖХ [120]. ВЭЖХ использована для разделения ряда эритромицинов [121]. Карбомицин также охарактеризован в различных системах бумаж-

ной хроматографии и ТСХ [122—127] и с помощью противоточного распределения [128].

Компоненты А, В, С₁ и С₂ мегаломицина разделены с помощью ТСХ на силикагеле G в системе хлороформ — метанол (3:2) [129, 130] и на оксиде алюминия типа Е (Merck) в системе этилацетат — метанол (9:1) [131]. Последняя система использована также для характеристики 4'-пропионилмегаломицина А. Йозамицин был отделен от его моно- и диацетилпроизводных с помощью ТСХ на оксиде алюминия в системе бутилацетат — метилэтилкетон — вода (40:9:1) [132]. Антибиотики, относящиеся к группе ювенимицина, можно разделить на пластинках с Spotfilm F или силикагелем в системе хлороформ — метанол — 17%-ный водный аммиак (10:3:5) [133], а компоненты группы А — на оксиде алюминия в той же системе [133].

Для характеристики олеандомицина использована хроматография на бумаге ватман № 1 [134] и на бумаге тойо № 51 [135] в различных системах растворителей. В случае ТСХ для обнаружения антибиотиков служат биоавтография [136, 137] и окрашивающие реагенты [138, 139]. С помощью ВЭЖХ удалось разделить 10 лейкомицинов, времена удерживания которых расположены в диапазоне от 1,5 до 25,8 мин [140].

Ниддамицин и дезизовалерилниддамицин были разделены на силикагеле в двух системах растворителей [141]. Ряд смесей растворителей использован для характеристики розарамицина с помощью хроматографии на бумаге тойо № 51 [127] и ТСХ на силикагеле [142, 143]. Метод количественного определения розарамицина в сыворотке крови с помощью ВЭЖХ описан Лином и др. [144]. Для разделения макролидов, в том числе и спирамицинов, пригодна ТСХ в системе хлороформ — метанол — 17%-ный аммиак и бутанол — уксусная кислота — вода (3:1:1) [142]. Эти антибиотики обнаруживают путем нагревания пластинок при 100 °С и опрыскивания 50%-ным раствором фосфорной кислоты в метаноле. Маридомицины были разделены с помощью ТСХ на силикагеле [145—148] и хроматографии на бумаге, пропитанной парафином [145].

9.3.3. Пенициллины

Число полусинтетических пенициллинов, созданных в последние несколько лет, выражается поистине астрономической цифрой. Для разделения этих антибиотиков разработаны многочисленные методы бумажной и тонкослойной хроматографии. В последнее время основным методом качественного и количественного анализа некоторых из этих соединений стала ВЭЖХ. Ниже приведен обзор некоторых из наиболее современных методик.

Многие фосфиниминобензилпенициллины разделены с помощью бумажной хроматографии в системах бутанол — этанол — вода и бутанол — уксусная кислота — вода [149]. Бензолсульфонаты 6-аминопенициллановой кислоты хроматографировали в системе бутанол — этанол — вода (1:1:1), для обнаружения пятен бумажную хроматограмму опрыскивали раствором фенилацетилхлорида [150]. Чтобы отличить друг от друга различные бутилпенициллины, использовали хроматографию на бумаге ватман № 1 в системе бутанол — пиридин — вода (1:1:1) [151]. Для разделения пенициллинов использованы четыре системы растворителей, а для их обнаружения — метод биоавтографии с помощью *Staphylococcus aureus* [54]. ТСХ на силикагеле в различных системах растворителей была применена для характеристики разнообразных пенициллинов [152—159]. Обращенно-фазовая ТСХ позволяет разделить смесь, содержащую метициллин, пенициллин, феноксиметилпенициллин, фенетициллин, пропициллин, оксациллин, доксациллин и дидоксациллин [160]. Многие представители этой группы соединений могут быть охарактеризованы с помощью ТСХ на силикагеле в четырех системах растворителей [161]. ВЭЖХ была использована для характеристики 6-аминопенициллановой кислоты и пенициллинов G и V [162], а также для отделения ампициллина от пенициллинов G и V [58, 163]. Для разделения некоторых пенициллинов с помощью ВЭЖХ опробован ряд сорбентов и подвижных фаз [164].

9.3.4. Цефалоспорины

К настоящему времени уже известно громадное число полусинтетических цефалоспоринов, и постоянно продолжают появляться все новые представители этой группы антибиотиков. Поэтому практически невозможно описать все хроматографические системы, используемые для разделения этих соединений, и в данном разделе будут приведены лишь некоторые из таких систем. Вместе с тем многие из них могут оказаться вполне пригодными для анализа и не упомянутых здесь цефалоспоринов.

Цефалоспорины были разделены с помощью бумажной хроматографии в системах бутанол-1 — уксусная кислота — вода [165—168] и бутанол-1 — этанол — вода [169—171] различного состава, а также в других системах растворителей, содержащих либо не содержащих буферы [165, 169—178]. Ряд сложных эфиров цефалоспоринов хроматографировали на пластинках с силикагелем в девяти системах растворителей [179]. Зоны обнаруживали путем опрыскивания хроматограмм раствором нингидрина в смеси этанола, 2,4,6-коллидина и уксусной кислоты и последующего нагревания. Цефалоспорин С хроматографировали

на тонкослойных пластинках с DEAE-целлюлозой в 0,05 М натрий-ацетатном буфере [180]. Для идентификации большой группы цефалоспоринов использовали ТСХ на силикагеле в системах хлороформ — этилацетат [58, 181—183]. N-Ацетилцефалоспорины охарактеризованы с помощью ТСХ на целлюлозе в четырех системах растворителей [184]. На пластинках selecta с силикагелем в трех системах растворителей осуществлено разделение 23 различных производных цефалоспоринов [185]. 7-Аминоцефалоспоровая кислота, ее диацетилпроизводное и лактон разделены на силикагеле [186], а диацетилцефалоспорин С охарактеризован с помощью ТСХ на целлюлозе в шести системах растворителей [187]. Обращенно-фазовая ТСХ использована для разделения цефтазола, цефазолина, цефалексина, цефалотина и цефалоридина [188].

ВЭЖХ позволяет отделить цефалоспорин от его различных ацетилпроизводных [184]. Аналогичным образом с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ были идентифицированы и отделены друг от друга цефалоридин, цефазолин, цефрадин, цефалоглицин и цефалотин [189]. ВЭЖХ была использована для разделения смесей, содержащих 6-аминопенициллановую и 7-аминоцефалоспоровую кислоты, и различных смесей цефалоспоринов (например, содержащих цефалексин, цефазолин, цефрадин, цефалоглицин, цефалотин) [189]. Специфические цефалоспорины также охарактеризованы рядом исследователей. С помощью ВЭЖХ идентифицированы цефалотин [190, 191] и цефрадин [185], а цефамицины — с помощью бумажной хроматографии [168, 192] и электрофореза [168]. Цефалоглицин был отделен от диацетилцефалоглицина и его лактона с помощью ВЭЖХ [193]. Для идентификации цефалоридина была использована хроматография на колонке с обращенной фазой корасил в системе метанол — ацетат аммония [194].

9.3.5. Тетрациклины

Имеется множество публикаций, касающихся методов хроматографии антибиотиков семейства тетрациклинов, поэтому здесь представлены схемы идентификации лишь некоторых из появившихся в последнее время антибиотиков и сравнительно новые методики.

Тетрациклин, окситетрациклин, хлортетрациклин, ролитетрациклин, диметилхлортетрациклин, доксициклин и метациклин различают по их хроматографической подвижности на полиамиде II в пяти системах растворителей и по окраске пятен, образующихся при обработке тонкослойных хроматограмм соответствующим обнаруживающим реагентом [195]. Шесть тетрациклинов охарактеризованы с помощью ТСХ на силикагеле в двух

системах растворителей, содержащих винную кислоту, и с помощью трех окрашивающих реагентов. Для идентификации антибиотиков использованы значения R_f и цветные реакции [196]. Тетрациклин охарактеризован с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой μ -бондапак в режиме детектирования по поглощению в УФ-области [197]. Чтобы отделить этот антибиотик от окситетрациклина, доксицилина и хлортетрациклина, использованы различные методы ВЭЖХ [58]. В работе [164] описано разделение разнообразных антибиотиков, в том числе и тетрациклинов, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках с мелкозернистыми сорбентами (размер частиц 10 мкм) порасил C_{18} , лихросорб C_{18} , μ -бондапак C_{18} и сферисорб ODS.

9.3.6. Полипептиды

Бацитрацин хроматографировали на пластинках с целлюлозой MN-300 и кизельгелем 60 в различных системах растворителей и обнаруживали с помощью биоавтографии на пленках с культурой *Sarcina lutea* [46]. В другом методе ТСХ использованы силикагель, система этанол — вода — аммиак (8:8:1) и биоавтография с помощью микроорганизма *Micrococcus flavis* [198]. В работе [199] описан электрофорез бацитрацина в акриламидном геле. После окрашивания электрофореграммы нафталиновым черным этот антибиотик обнаруживается в виде светло-голубой зоны. Для характеристики бацитрацина использована ВЭЖХ на колонке с бондапаком C_{18} /корасилом [200]. Хроматография в режиме градиентного элюирования показала, что препарат содержит не менее десяти компонентов [201].

С помощью бумажной и тонкослойной хроматографии были разделены полимиксины S_1 и T_1 [202], а также полимиксины В и F [203]. Эти антибиотики хроматографировали также на пластинках Gelman ITLC типа SAF [203]. Электрофоретическая система, описанная для бацитрацина, пригодна и для характеристики полимиксинов. ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования позволяет отделить полимиксин B_1 от B_2 [201]. Многочисленные производные полимиксинов охарактеризованы с помощью ТСХ на силикагеле в системе бутанол-1 — пиридин — уксусная кислота — вода (30:10:3:12) [204]. Подробные методики разделения и определения характеристик пептидных антибиотиков — низина, субтилина, циннамицина, дурамицина, теломицина, стендомицина, туберактиномицинов и грамицидинов — описаны в обзоре Гросса [205].

9.3.7. Полиены

ТСХ на силикагеле 60F₂₅₄ (Merck) в системе бутанол-1 — этанол — ацетон — 32%-ный гидроксид аммония (2:5:1:3) позволяет отделить амфотерицин В от его разнообразных слож-

ных эфиров, а также от кандицидина, нистатина и сложных эфиров этих антибиотиков [206]. Для разделения амфотерицина А и аскозина на силикагеле G использованы различные системы растворителей [207]. С помощью противоточного распределения можно разделить амфотерицины А и В [207, 208]. Обращенно-фазовая ВЭЖХ была использована для идентификации амфотерицина В [209].

Кандицидин, кандидин, кандегексин, микогептин, нистатин и трихомицин можно различить с помощью тех же методов ТСХ и противоточного распределения, которые применяются в случае амфотерицинов. Чтобы охарактеризовать леворин, использовали ТСХ на силикагеле G [206]. Компоненты этого антибиотика можно также разделить с помощью противоточного распределения [207]. Для идентификации леворина пригодна ВЭЖХ [210]. Противогрибковый антибиотик 67-121 был отделен от большинства других полиенов на силикагеле G в системе бутанол-1 — уксусная кислота — вода — диоксан (6:2:2:1) [211], а разделение этого препарата на входящие в его состав четыре компонента осуществлено в системе хлороформ — метанол — вода (2:2:1) [212].

9.3.8. Другие антибиотики

В этом разделе рассмотрен ограниченный набор антибиотиков — таких, которые представляют наибольший интерес и (или) которые охарактеризованы с помощью сравнительно новых методов. Они приведены по возможности в алфавитном порядке.

С целью различить актиномицины С₂, С₃ и D использована ВЭЖХ на колонке с бондапаком C₁₈/корасилом в системе ацетонитрил — вода (1:1) [213]. Предварительное фракционирование актиномицинов из *Micromonospora flavidensis* на отдельные группы осуществлено на силикагеле GF в системе хлороформ — метанол — вода (2:1:1) [214], а в системе дихлорметан — ацетон (7:3) полученные смеси разделены на составляющие их компоненты [215]. Апрамицин хроматографировали на бумаге и силикагеле [39]. Для разделения блеомицинов использовали хроматографию на бумаге тойо № 51 в 10%-ном растворе хлорида аммония [216], ТСХ на силикагеле [216, 217] и электрофорез [216]. Хлорамфеникол хроматографировали на бумаге [218] и тонкослойных пластинках с целлюлозой [46], силикагелем [177], силанизированным силикагелем HF-254 [219], авицелом [220] и кизельгуром [83]. Описаны также методики анализа этого антибиотика с помощью ГЖХ [221, 222] и ВЭЖХ [164, 185]. Разработан метод количественного определения клиндамицина, его многочисленных производных и линкомицинов, основанный на использовании ТСХ [223].

Дауномицин охарактеризован с помощью ВЭЖХ [184]. Компоненты диумидина разделены с помощью ТСХ [224, 225] и противоточного распределения [225]. Чтобы охарактеризовать гризеофульвин, использовали ГЖХ [226] и ВЭЖХ [185, 227]. 2-Ацилпроизводные линкомицина разделены на тонкослойных пластинках и с помощью газовой хроматографии на колонке, содержащей 3% OV-1 на газохроме Q [228]. С целью различить митрамицины А, В и С использован ряд ТСХ-систем [299—231], а также метод ВЭЖХ, который пригоден и для препаративного выделения этих антибиотиков [232]. Из смеси недавно обнаруженных веществ с антибактериальной активностью, продуцируемых микроорганизмом *Mycoplasma* типа RP III, с помощью бумажной хроматографии, ТСХ и электрофореза выделены два антибиотика [233, 234].

Нокардицины Е и F разделены на тонкослойных хроматографических пластинках № 6065 фирмы Eastman в трех системах растворителей [235]. Чтобы различить новобиоцин и дигидроновобиоцин, использована ТСХ на пропитанном буферным раствором кизельгуре [236] и на силанизированном силикагеле [237] в разнообразных системах растворителей. Новобиоцин охарактеризован также с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [58]. Патулин охарактеризован с помощью ГЖХ на колонке с 10% DC-200 и 15% QF-1 (1:1 по объему) на газохроме Q [238, 239]. Плевромутулины разделены на силикагеле G в трех системах растворителей [240]. Рифампицин и два его производных хроматографировали на пропитанном буферным раствором кизельгуре H [240]. Различные методы ТСХ использованы для идентификации рифампина и других рифамицинов [241—246]. Римоцидин охарактеризован по хроматографической подвижности на силикагеле G в нескольких системах растворителей [247]. Для обнаружения этого антибиотика служит специфическая цветная реакция [247]. Подробные методики хроматографического анализа антибиотиков весьма обширного семейства стрептотрицина приведены в обзоре Хохлова [248]. Для идентификации ванкомицина использована ВЭЖХ на колонке с сорбентом бондапак C₁₈ [249].

Литература

1. Perlman D. — In: Structure — Activity Relationships Among the Semisynthetic Antibiotics./Ed. Perlman D. — New York: Academic Press, 1977, p. xi.
2. Betina V. J. Chromatogr., 15, 379 (1964).
3. Addison E., Clark R. G. J. Pharm. Pharmacol., 15, 286 (1963).
4. Dobrecky J., Vazquez E. A., Amper R. Soc. Arg. Farm. Bioquim. Ind., 8, 204 (1968); C. A., 71, 42362r (1969).
5. Aszalos A., Davis S., Frost D. J. Chromatogr., 37, 487 (1968).

6. Schmitt J.-P., Mathis C. *Ann. Pharm. Fr.*, 205 (1970).
7. Ikekawa T., Iwami F., Akita E., Umezawa H. *J. Antibiot.*, **16**, 56 (1963).
8. Ochab S., Borowiecka B. *Diss. Pharm. Pharmacol.*, **20**, 449 (1968).
9. Borowiecka E. *Diss. Pharm. Pharmacol.*, **22**, 345 (1970).
10. Nishimoto Y., Tsuchida E., Toyoshima S. *Yakugaku Zasshi*, **87**, 516 (1967); *C. A.*, **67**, 67635n (1967).
11. Ito Y., Namba M., Nagahama N., Yamaguchi T., Okuda T. *J. Antibiot.*, **17**, 218 (1964).
12. Zuidweg M. H. J., Oostendorp J. G., Bos C. J. K. *J. Chromatogr.*, **42**, 552 (1969).
13. Brodasky T. F. *Anal. Chem.*, **35**, 343 (1963).
14. Prath J. *Acta Chem. Scand.*, **6**, 1237 (1952).
15. Nakamura S., Yajima T., Hamoda M., Nishmura T., Ishizuki M., Takeuchi T., Tanaka N., Umezawa H. *J. Antibiot.*, **20**, 210 (1967).
16. Muramatsu I., Sofaku S., Hagitani A. *J. Antibiot.*, **25**, 189 (1972).
17. de Albuquerque M. F., de Andrade Lyra F. D., de Lima O. G., de Oliveira C. C., de Barros Coelho J. S., Maciel G. M., de Salete Barros Cavalcanti M. *Recife*, **6**, 35 (1966).
18. Lancini G. C., Sensi P. *Experientia*, **20**, 83 (1964).
19. Argoudelis A. D. *J. Antibiot.*, **25**, 171 (1972).
20. Corbuz R., Ettlinger L., Gaumann E., Keller-Schierlein W., Kradolfer F., Kyburz E., Neipp L., Prelog V., Wettstein A., Zahner H. *Helv. Chim. Acta*, **39**, 304 (1956).
21. Iquchi S., Yamamoto M., Goromaru T. *J. Chromatogr.*, **24**, 182 (1966).
22. Tsuji K., Robertson J. H. *Anal. Chem.*, **41**, 133 (1969).
23. van Giessen B., Tsuji K. *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1068 (1971).
24. Hamill R. L., Sullivan H. R., Gorman M. *Appl. Microbiol.*, **18**, 310 (1969).
25. Issaq H. J., Bair E. W., Wei T., Meyers C., Aszalos A. *J. Chromatogr.*, **133**, 291 (1977).
26. Aszalos A., Frost D. *Methods Enzymol.*, **43**, 172 (1975).
27. Aszalos A., Davis S., Frost D. *J. Chromatogr.*, **37**, 487 (1968).
28. Aszalos A., Issaq H. J. *J. Liquid Chromatogr.*, **3**, 867 (1980).
29. Wagman G. H., Weinstein M. J. *Chromatography of Antibiotics*. *J. Chromatogr. Library Series*, Vol. 1. — Amsterdam: Elsevier, 1973.
30. Weinstein M. J., Wagman G. H. (Editors), *Antibiotics: Isolation, Separation and Purification*, *J. Chromatogr. Library Series*, Vol. 15. — Amsterdam: Elsevier, 1978.
31. Zweig G., Sherma J. (Editors), *Handbook of Chromatography*. Vol. 1. — OH. Cleveland: CRC Press, 1972, pp. 458 and 616.
32. Lott P. F., Dias J. R., Slahck S. C. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 571 (1978).
33. Meyers E., Chang C. A. *J. Antibiot.*, **32**, 846 (1979).
34. Vondráček M. — In: *Chromatography*/Ed. Heftmann E. 2nd Edn. — New York: Reinhold, p. 718.
35. Vondráček M. — In: *Chromatography*/Ed. E. Heftmann, 3rd Edn. — New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 818.
36. Weinstein M. J., Wagman G. H., Oden E. M., Marquez J. A. *J. Bacteriol.*, **94**, 789 (1967).
37. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A. *Pat. CIAA* 3951746; Apr. 20, 1976.
38. Wagman G. H., Marquez J. A., Weinstein M. J. *J. Chromatogr.*, **34**, 210 (1968).
39. Nara T., Takasawa S., Okachi R., Kawamoto I., Yamamoto M., Sato S., Sato T. *Pat. CIAA* 3976768; Aug. 24, 1976.
40. Kantor N., Selzer G. *J. Pharm. Sci.*, **57**, 2170 (1968).
41. Wagman G. H., Bailey J. V., Miller M. M. *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1319 (1968).
42. Berdy J., Pauncz J. K., Vajna M., Horváth Gy., Gyimesi J., Koczka I. *J. Antibiot.*, **30**, 945 (1977).

43. Maehr H., Schaffner C. P. J. Chromatogr., 30, 572 (1967).
44. Egan R. S., DeVault R. L., Mueller S. L., Levenberg M. I., Sinclair A. V., Stanascek R. S. J. Antibiot., 28, 29 (1975).
45. Umezawa H., Yagisawa M., Matsuhashi Y., Naganawa H., Yamamoto H., Kondo S., Takeuchi T. J. Antibiot., 26, 612 (1973).
46. Troonen H., Roelants P., Boon B. Пат. США 4002530; Jan. 11, 1976.
47. Byrne K. M., Kershner A. S., Maehr H., Marquez J. A., Schaffner C. P. J. Chromatogr., 131, 191 (1977).
48. Anhalt J. P. Antimicrob. Ag. Chemother., 11, 651 (1977).
49. Peng G. W., Gadalla M. A. F., Peng A., Smith V., Chiou W. L. Clin. Chem., 23, 1838 (1977).
50. Naito T., Nakagawa S., Narita Y., Toda S., Abe Y., Oka M., Yamashita H., Yamasaki T., Fujisawa K., Kawaguchi H. J. Antibiot., 27, 851 (1974).
51. Nara T., Takasawa S., Okachi R., Kawamoto I., Yamamoto M., Sato S., Sato T., Morikawa A. Пат. США 3939043; Feb. 17, 1976.
52. Rothrock J. W., Goegelman R. T., Wolf F. J. Antibiot. Ann., 796 (1958—1959).
53. Rothrock J. W., Putter I. Пат. США 3032547; Sep. 12, 1958.
54. Weinstein M. J., Ludemann G. M., Wagman G. H., Marquez J. A. Пат. США 3819611; June 25, 1974.
55. Chatterjee N. R. Ind. J. Chem., 13, 1182 (1975).
56. Ochab S. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 23, 105 (1973).
57. Tsuji K., Robertson J. H. Anal. Chem., 42, 1661 (1970).
58. Varian Aerograph Application Notes, No. 6, August 19, 1974.
59. Fujii A., Maeda K., Umezawa H. J. Antibiot., 21, 340 (1968).
60. Shier W. J., Rinehart K. L., Jr., Gottlieb D. Пат. США 3833556; Sep. 3, 1974.
61. Naito T., Nakagawa S., Abe Y. Пат. США 3904597; Sep. 9, 1975.
62. Umezawa H., Maeda K., Kondo S., Umezawa S. Пат. ФРГ 2423591; Dec. 5, 1974.
63. Umezawa H., Maeda K., Kondo S., Umezawa S. Пат. США 3940382; Feb. 24, 1976.
64. Leach B. E., Teeters C. M. J. Amer. Chem. Soc., 73, 2794 (1951).
65. Pan S. C., Dutcher J. D. Anal. Chem., 28, 836 (1956).
66. Umezawa H., Murase M., Yamazaki S. J. Antibiot., 12, 341 (1959).
67. Rinehart K. L., Jr., Argoudelis A. D., Goss W. A., Sohler A., Schaffner C. P. J. Amer. Chem. Soc., 82, 3938 (1960).
68. Kaiser P. G. Anal. Chem., 35, 552 (1963).
69. Maehr H., Schaffner C. P. Anal. Chem., 36, 104 (1964).
70. Majumdar M. K., Majumdar S. K. Anal. Chem., 39, 215 (1967).
71. Majumdar M. K., Majumdar S. K. Appl. Microbiol., 17, 763 (1969).
72. Shier W. T., Rinehart K. L., Jr., Gottlieb D. Biochemistry, 63, 198 (1969).
73. Munakata K., Oda T., Mori T., Ito H. Пат. США 3870698; Mar. 11, 1975.
74. Baud H., Betencourt A., Peyre M., Penasse L. J. Antibiot., 30, 720 (1977).
75. Hanessian S., Masse R., Capmeau M.-L. J. Antibiot., 30, 893 (1977).
76. Foppiano R., Brown B. P. J. Pharm. Sci., 54, 206 (1965).
77. Borowiecka B. Diss. Pharm. Pharmacol., 24, 210 (1972).
78. Снежкова Л. П., Астанина Л. Н. Антибиотики, 17, 263 (1972).
79. Baudet M. J. Pharm. Belg., 31, 247 (1976).
80. Brodasky T. F. Anal. Chem., 35, 343 (1963).
81. Weinstein M. J., Wagmann G. H., Marquez J. A. Пат. США 3956068; May 11, 1976.
82. Munakata K., Oda T., Mori T., Ito H. Пат. США 3870698; Mar. 11, 1975.
83. Baldini F., Frati G., Paezzani G., Ambanelli G. Ind. Conserve, 48, 135 (1973).

84. Carr J. P., Stretton R. J., Watson J. W. Final Year Study Proj Theses, 10, 17 (1969); Pharm. Anal., 73, 247 (1970).
85. Stretton R. J., Carr J. P., Watson-Walker J. J. Chromatogr., 45, 155 (1969).
86. Prath J. Acta Chem. Scand., 6, 1237 (1952).
87. Tsuji K., Robertson J. H. Anal. Chem., 41, 1332 (1969).
88. van Giessen B., Tsuji K. J. Pharm. Sci., 60, 1068 (1971).
89. Weinstein M. J., Marquez J. A., Testa R. T., Wagman G. H., Oden E. M., Waitz J. A. J. Antibiot., 23, 551 (1970).
90. Wagman G. H., Testa R. T., Marquez J. A. J. Antibiot., 23, 555 (1970).
91. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A. Пат. США 3956068; May 11, 1976.
92. Pereira J. N. J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng., 3, 79 (1961).
93. Hedding H. Acta Chem. Scand., 20, 1743 (1966).
94. Nussbaumer P. A., Schorperet M. Pharm. Acta Helv., 40, 205, 477 (1965).
95. Sato T., Ikeda H. Sci Papers Inst. Phys. Chem. Res., Tokyo, 59, 159 (1965).
96. Bossuyt R., Van Tenterghen R., Waes G. J. Chromatogr., 124, 37 (1975).
97. Weinstein M. J., Wagman G. H., Testa R. T., Marquez J. R. Пат. США 3997403; Dec. 14, 1976.
98. Weinstein M. J., Ludemann G. M., Oden E. M., Wagman G. H. Antimicrob. Ag. Chemother., 1963, 1 (1964).
99. Munakata K., Oda T., Mori T., Ito H. Пат. США 3891506; June 24, 1975.
100. Naito T., Nakagawa S. Пат. США 3897412; July 29, 1975.
101. Baudet M. J. Pharm. Belg., 31, 247 (1976).
102. Umezawa H., Umezawa S., Maeda K., Tsuchiya O., Kondo S., Fukatsu S. Пат. ФРГ 2350169; Apr. 18, 1974.
103. Dion H. W., Woo P. W. K., Willmer N. E., Kern D. L., Onaga J., Fusari S. A. Antimicrob. Ag. Chemother., 2, 84 (1972).
104. Kawaguchi H., Tomita K., Hoshiya T., Miyaki T., Fujisawa K.-I., Kameda M., Numata K.-I., Konishi M., Tsukiura H., Hatori M., Koshiyama H. J. Antibiot., 27, 460 (1974).
105. Woo P. W. K. Пат. США 3960837; June 1, 1976.
106. Peng G. W., Jackson G. G., Chiou W. L. Antimicrob. Ag. Chemother., 12, 707 (1977).
107. Akita E., Tsuchiya T., Kondo S., Yasuda S., Umezawa S., Umezawa H. Пат. ФРГ 2342946; Mar. 14, 1974.
108. Fujiwara T., Tanimoto T., Matsumoto K., Kondo E. J. Antibiot., 31, 966 (1978).
109. Murai K., Sobin B. A., Celmer W. D., Tanner F. W. Antibiot. Chemother., 9, 485 (1959).
110. Kurath P., Egan R. S., Jones P. H. Пат. США 3681323; Aug. 1, 1972.
111. Pettinga C. W., Starke W. M., van Abeele F. R. J. Amer. Chem. Soc., 76, 569 (1954).
112. Wiley P. F., Gayle R., Pettinga C. W., Gerzon K. J. Amer. Chem. Soc., 79, 6074 (1957).
113. Stevens V. C., Pugh C. T., Davis N. E., Hoehn M. M., Ralston S., Sparks M. C., Thompkins L. J. Antibiot., 22, 551 (1969).
114. Kotula Z., Kaminska A. Med. Dosw. Microbiol., 19, 381 (1967); C. A. 68, 72292g (1968).
115. Banaszek A., Krowicki K., Zamojski A. J. Chromatogr., 32, 581 (1968).
116. Richard G., Radecka C., Hughes D. W., Wilson W. L. J. Chromatogr., 67, 69 (1972).
117. Flickinger M. C., Perlman D. J. Antibiot., 28, 307 (1975).
118. Vilim A., LeBelle M. J., Wilson W. L., Graham K. C. J. Chromatogr., 133, 239 (1977).
119. Kobrehel G., Tamburašev Z., Djokić S. J. Chromatogr., 133, 415 (1977).

120. Omura S., Suzuki Y., Nagakawa A., Hata T. J. Antibiot., **26**, 794 (1973).
121. Tsuji K. J. Chromatogr., **158**, 337 (1978).
122. Osato T., Yagishita K., Umezawa H. J. Antibiot., **8**, 161 (1955).
123. Murai K., Sobin B. A., Celmer W. D., Tanner F. W. Antibiot. Chemother., **9**, 485 (1959).
124. Koshiyama H., Okanishi M., Ohmori T., Miyaki T., Tsukiura H., Matsuzaki M., Kawabuchi H. J. Antibiot., **16**, 59 (1963).
125. DeBoer C., Dietz A., Wilkins J. R., Lewis C. N., Savage G. M. Antibiot. Ann., 831 (1954—1955).
126. Kawamoto I., Okachi R., Kato H., Yamamoto S., Takahashi I., Takasawa S., Nara T. J. Antibiot., **27**, 493 (1974).
127. Wagman G. H., Waitz J. A., Marquez J., Murawski A., Oden E. M., Testa R. T., Weinstein M. J. J. Antibiot., **25**, 641 (1972).
128. Hochstein F. A., Murai K. J. Amer. Chem. Soc., **76**, 5080 (1954).
129. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A., Oden E. M., Testa R. T., Waitz J. A. Antimicrob. Ag. Chemother., **1968**, 260 (1969).
130. Marquez J. A., Murawski A., Wagman G. H. J. Antibiot., **22**, 259 (1969).
131. Nara T., Takasawa S., Kawamoto I., Yamamoto S. Пат. ФРГ 2301080; July 19, 1973.
132. Osono T., Moriyama K., Murakami K., Umezawa H. Пат. США 3959252; May 25, 1976.
133. Shibata M., Hatano K., Yamana H., Kishi T., Higashide E. Пат. ФРГ 2034245; Feb. 25, 1971.
134. Glazko A. J., Dill W. A., Rebstock M. C. J. Biol. Chem., **183**, 679 (1950).
135. Osato T., Yagishita K., Umezawa H. J. Antibiot., **8**, 161 (1955).
136. Kierstead R. W., LeMahieu R. A., Pruess D. Пат. США 3928387; Dec. 23, 1975.
137. Nussbauer P. A. Pharm. Acta Helv., **40**, 210 (1965).
138. Glazko A. J., Dill W. A., Rebstock M. C. J. Biol. Chem., **183**, 679 (1950).
139. Wagman G. H., Waitz J. A., Marquez J. A., Murawski A., Oden E. M., Testa R. T., Weinstein M. J. J. Antibiot., **25**, 641 (1972).
140. Omura S., Suzuki Y., Nakagawa A., Hata T. J. Antibiot., **26**, 794 (1973).
141. Theriault R. J. Пат. США 3948884; Apr. 6, 1976.
142. Wagman G. H., Waitz J. A., Marquez J., Murawski A., Oden E. M., Testa R. T., Weinstein M. J. J. Antibiot., **25**, 641 (1972).
143. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A. Пат. США 4161523; July 17, 1979.
144. Lin C., Kim H., Schuessler D., Oden E., Symchowicz S. Antimicrob. Ag. Chemother., 780 (1980).
145. Higashide E., Hasegawa T., Ono H., Asai M., Muroi M., Kishi T. Пат. США 3691280; Sep. 12, 1972.
146. Muroi M., Izawa M., Asai M., Kishi T., Mizuno K. J. Antibiot., **26**, 199 (1973).
147. Kunishige N., Kawamura K., Muroi M., Kishi T. Chem. Pharm. Bull., **23**, 3075 (1975).
148. Kondo K. J. Chromatogr., **169**, 337 (1979).
149. Clayton J. P., Hubbard R. Пат. США 3923787; Dec. 2, 1975.
150. Fosker T. R., Naylor J. H. C. Пат. США 3663563; May 16, 1972.
151. Vanderhaeghe H., Vlietinck A., Claesen M., Parmentier G. J. Antibiot., **27**, 169 (1974).
152. Корчагин В. Б., Серова А. И., Дементьева С. П., Навольнева И. Н., Иноземцева И. И., Трахтенберг Д. М., Котова Н. И. Антибиотики, **16**, 8 (1971).
153. O'Neal P. J. Proc. Ass. Anal. Chem., **39** (1974).
154. Manni P. E., Lipper R. A., Blaha J. M., Hem S. L. J. Chromatogr., **76**, 512 (1973).

155. Baldini F., Frati G., Pezzani G., Ambanelli G. Ind. Conserve, **48**, 135 (1973).
156. Корчагин В. Б., Серова Л. И., Дементьева С. П., Навольнева И. Н., Иноземцева И. И., Трахтенберг Д. М., Котова Н. И. Антибиотики, **16**, 410 (1971).
157. Pokorny M., Vitezič N., Japelj M. J. Chromatogr., **77**, 458 (1973).
158. Walash M. L., Hassan S. M. J. Drug. Res. Egypt., **5**, 111 (1973).
159. Marin J. L., Duncombe R. D., Shaw W. H. C. Analyst (London), **100**, 243 (1975).
160. Byrd A. E., Marshall A. C. J. Chromatogr., **63**, 313 (1971).
161. Fosker G. R., Nayler J. H. C. Пат. США 3663563; May 16, 1972.
162. White E. R., Carroll M. A., Zarembo J. E., Bender A. E. J. Antibiot., **28**, 205 (1975).
163. Tsuji K., Robertson J. H. J. Pharm. Sci., **64**, 1542 (1975).
164. White E. R., Carroll M. A., Zarembo J. E. J. Antibiot., **30**, 811 (1977).
165. Jeffrey J. D.A., Abraham E. P., Newton G. G. F. Biochem. J., **81**, 591 (1961).
166. Hale C. W., Newton G. G. F., Abraham E. P. Biochem. J., **79**, 403 (1961).
167. Fechtig B., Vischer E., Bickel H., Bosshardt R., Urech J. Пат. США 3697515; Oct. 10, 1972.
168. Brannon D. R., Mabe J. A., Fukuda D. S. J. Antibiot., **29**, 121 (1976).
169. Loder B., Newton G. G. F., Abraham E. P. Biochem. J., **79**, 408 (1961).
170. Weir N. G. Пат. США 3929780; Dec. 30, 1975.
171. Weir N. G. Пат. США 3974152; Aug. 10, 1976.
172. Newton G. G. F., Abraham E. P. Biochem. J., **62**, 651 (1956).
173. Ott J. L., Godzeski C. W., Pavey D., Farran J. D., Horton D. R. Appl. Microbiol., **10**, 515 (1962).
174. Olsen B. H., Jennings J. C., Junek A. J. Science, **117**, 76 (1953).
175. Horton H. S., Abraham E. P. Biochem. J., **50**, 168 (1952).
176. Sullivan H. R., McMahon R. E. Biochem. J. 976 (1967).
177. Brannon D. R., Fukuda D. S., Mabe J. A., Huber F. M., Whitney J. G. Antimicrob. Ag. Chemother., **1**, 237 (1972).
178. Stapley E. O., Jackson M., Hernandez S., Zimmerman S. P., Currie S. A., Mochales S., Mata J. M., Woodroof H. B., Hendlin D., Antimicrob. Ag. Chemother., **2**, 122 (1972).
179. Fechtig B., Peter H., Bickel H., Vischer B. Helv. Chim. Acta, **51**, 1108 (1968).
180. Nash C. H., Huber F. M. Appl. Microbiol., **22**, 6 (1971).
181. Bouchaudon J., LeRoy P., Messer M. N. Пат. США 3975385; Aug. 17, 1976.
182. Bickel H., Muller J., Bosshardt R., Peter H., Fechtig B. Пат. США RE 29119; Jan. 18, 1977.
183. Nakao H., Yanagisawa H., Nagano M., Shimizu B., Kanedo M., Sugawara S. Пат. США 4007177; Feb. 8, 1977.
184. Traxler P., Treichler H. J., Nuesch J. J. Antibiot., **28**, 605 (1975).
185. Crooij P., Colinet A. Пат. США 3912728; Oct. 14, 1975.
186. Budd C. J. J. Chromatogr., **76**, 509 (1973).
187. Fujisawa Y., Kikuchi M., Kanzaki T. J. Antibiot., **30**, 775 (1977).
188. Sawai T., Matsuba K., Tamura A., Yamagishi S. J. Antibiot., **32**, 59 (1979).
189. White E. R., Carroll M. A., Zarembo J. E., Bender A. D. J. Antibiot., **28**, 205 (1975).
190. Rolewicz T. F., Mirkin B. L., Cooper M. J., Anders M. W. Clin. Pharmacol. Ther., **22**, 928 (1977).
191. Nilsson-Ehel I., Yoshikawa T. T., Schotz M. C., Guze L. B. Antimicrob. Ag. Chemother., **13**, 221 (1978).
192. Fukase H., Hasegawa T., Hatano K., Iwasaki H., Yoneda M. J. Antibiot., **29**, 113 (1976).

193. Haginaka J., Nakagawa T., Uno T. J. Antibiot., **32**, 462 (1979).
194. Wold J. S., Turnipseed S. A. J. Chromatogr., **136**, 170 (1977).
195. Santos M. S., Mamede Santos M. I., Goncalves L. C., Morgadinho M. T. Bol. Fac. Farm., Univ. Coimbra, Ed. Cient., **33**, 127 (1973).
196. Wang R. T., Tsai Y. H. Tai-Wan K'o Hsueh., **27**, 36 (1973).
197. Nilsson-Ehle I., Yoshikawa T. T., Schotz M. C., Guze L. B. Antimicrob. Ag. Chemother., **9**, 754 (1976).
198. Bossuyt R., Van Tenterghem R., Waes G. J. Chromatogr., **124**, 37 (1975).
199. Coombe R. G. Aust. J. Pharm. Sci., N. S. 1, **6** (1972).
200. Tsuji K., Robertson J. H., Bach J. A. J. Chromatogr., **99**, 597 (1974).
201. Tsuji K., Robertson J. H. J. Chromatogr., **112**, 663 (1975).
202. Shoji J., Hinoo H., Wakisaka Y., Koizumi K., Mayama M., Matsuura S. J. Antibiot., **30**, 1029 (1977).
203. Parker W. L., Rathnum M. L., Dean L. D., Nimeck M. W., Brown W. E., Meyers E. J. Antibiot., **30**, 767 (1977).
204. Igloy M., Mizsei A. J. Chromatogr., **28**, 458 (1967).
205. Gross E. — In: Antibiotics. Isolation, Separation and Purification./Eds. Weinstein M. J., Wagman G. H., J. Chromatogr. Library Series. Vol. 15. — Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 415.
206. Bruzzese T., Cambieri M., Recusani F. J. Pharm. Sci., **64**, 462 (1975).
207. Thomas A. H. Analyst (London), **101**, 321 (1976).
208. Linke H. A. P., Mechlinski W., Schaffner C. P. J. Antibiot., **27**, 155 (1974).
209. Nilsson-Ehle I., Woshikawa T. T., Edwards J. E., Schotz M. C., Guze L. B. J. Infec. Dis., **135**, 414 (1977).
210. Hansen S. H., Thomsen M. J. Chromatogr., **123**, 205 (1976).
211. Wagman G. H., Testa R. T., Patel M., Marquez J. A., Oden E. M., Waitz J. A., Weinstein M. J. Antimicrob. Ag. Chemother., **7**, 457 (1975).
212. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A., Patel M. G. Пат. США 4027015; May 31, 1977.
213. Rzeszotarski W. J., Mauger A. B. J. Chromatogr., **86**, 246 (1973).
214. Wagman G. H., Marquez J. A., Watkins P. D., Gentile F., Murawski A., Patel M., Weinstein M. J. Antimicrob. Ag. Chemother., **9**, 465 (1976).
215. Weinstein M. J., Wagman G. H., Marquez J. A., Watkins P. D. Пат. США 3954970; May 4, 1976.
216. Fuji A., Takita T., Maeda K., Umezawa H. J. Antibiot., **26**, 396 (1973).
217. Nara T., Takasawa S., Okachi R., Kawamoto I., Kohagura M., Takahashi I. Пат. США 3922343; Nov. 25, 1975.
218. Glazko A. J., Dill W. A., Rebstock M. C. J. Biol. Chem., **183**, 679 (1950).
219. Rangone R., Ambrosio C. Pharmacol. Ed. Prat., **26**, 237 (1971).
220. Chung G. S., Wang R. T. Tai-Wan K'o Hsueh., **27**, 27 (1973).
221. Nakagawa T., Masada M., Uno T. J. Chromatogr., **111**, 355 (1975).
222. Janssen G., Vanderhaeghe H. J. Chromatogr., **82**, 297 (1973).
223. Brown L. W. J. Pharm. Sci., **67**, 1254 (1978).
224. Sattler A., Kreuzig F. J. Antibiot., **28**, 200 (1975).
225. Slusarchyk W. A., Bouchard-Ewing J. L., Weisenborn E. L. J. Antibiot., **26**, 391 (1973).
226. Epstein W. L., Shah V. P., Riegelman S. Arch. Dermatol., **106**, 344 (1972).
227. Hackett L. P., Dusci L. J. J. Chromatogr., **155**, 206 (1978).
228. Morozowich W., Sinkula A. A., Markellar F. A., Lewis C. J. Pharm. Sci., **62**, 1102 (1973).
229. Stajner K., Blumauerova M., Callieri D. A. S., Vanek Z. Folia Microbiol. (Prague), **19**, 498 (1974).
230. Soben B. A., Routlen J. B., Rao K. V., March W. S., Garretson A. L. Пат. США 3906093; Sep. 16, 1975.
231. Soben B. A., Routlen J. B., Rao K. V., March W. S., Garretson A. L. Пат. США 3646194; Feb. 29, 1972.

232. *Srivastava S. C., Hornemann L. J.* Chromatogr., **161**, 393 (1978).
233. *Sakai T., Perlman D. J.* Antibiot., **28**, 749 (1975).
234. *Sylvestre M., Perlman D. J.* Antibiot., **28**, 73 (1975).
235. *Hosoda J., Aoki H., Imanake H.* Пат. США 4146536; Mar. 27, 1979.
236. *Murakawa T., Kono Y., Nishida M. J.* Antibiot., **25**, 243 (1972).
237. *Rangone R., Ambrosio C.* Farmaco, Ed. Prat., **26**, 237 (1971).
238. *Suzuki T., Fujimoto Y., Hoshino Y., Tanaka A. J.* Chromatogr., **105**, 95 (1975).
239. *Fujimoto Y., Suzuki T., Hoshino Y. J.* Chromatogr., **105**, 99 (1975).
240. *Knauseder F., Brandl E. J.* Antibiot., **29**, 125 (1976).
241. *Winsel K., Iwainsky H., Werner E., Eule H.* Pharmazie, **31**, 95 (1976).
242. *Birner J., Hodgson P. R., Lane W. R., Baxter E. H. J.* Antibiot., **25**, 356 (1972).
243. *Wilson W. L., Graham K. C., LeBelle M. J. J.* Chromatogr., **144**, 270 (1977).
244. *Celmer W. D., Sciavolino F. C., Routien J. B., Cullen T. C.* Пат. ФРГ 2500898; July 17, 1975.
245. *Marsili L., Rossetti V., Pasqualucci C.* Пат. США 4007169; Feb. 8, 1977.
246. *White R., Lancini G., Antonini P.* Бельг. пат. 832921; Dec. 17, 1975.
247. *Pandey R. C., Rinehart K. L., Jr.* J. Antibiot., **30**, 146 (1977).
248. *Khokhlov A. S.* — In: Antibiotics, Isolation, Separation and Purification./ Eds. Weinstein M. J., Wagman G. H. — Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 617.
249. *Kirchmeier R. L., Opton R. P.* Anal. Chem., **50**, 349 (1978).

Глава 10

Нуклеиновые кислоты

Г. Дж. Каулинг

10.1. Введение

Эта глава посвящена разделению нуклеиновых кислот и их компонентов с помощью тонкослойной, ионообменной и аффинной хроматографии, а также электрофореза на бумаге и в геле. Основные сведения об этих молекулах, в том числе их биологической роли и строении, можно почерпнуть из книг «Биохимия нуклеиновых кислот» [1] и «Молекулярная биология гена» [2]. Для более подробного ознакомления с практическими и теоретическими аспектами рассматриваемых в этой главе проблем можно обратиться либо к цитируемой литературе, либо к сборникам «Техника лабораторных работ в биохимии и молекулярной биологии» [3—6].

Как и в других обзорах на эту тему, описание методов разделения построено по традиционной схеме: от сравнительно простых соединений (азотистых оснований, нуклеозидов и нуклеотидов) к все более сложным — олигонуклеотидам и различным классам РНК и ДНК. В заключительных разделах основное внимание уделено использованию хроматографии и электрофореза при определении нуклеотидной последовательности и для разделения нуклеопротеидов. Как правило, вначале описываются методы хроматографии, а затем — электрофореза. Этот обзор не претендует на роль исчерпывающей монографии, он скорее дает оценку современному состоянию исследований в данной области, акцентируя внимание на достижениях последних нескольких лет. Во многих случаях приведены примеры использования конкретной методики с целью проиллюстрировать ее возможности.

10.2. Азотистые основания, нуклеотиды и нуклеозиды

10.2.1. Состав нуклеиновых кислот

Для определения состава нуклеиновых кислот их расщепляют, образующиеся азотистые основания, нуклеозиды и нуклеотиды разделяют и оценивают их относительное содержание. Перед

рассмотрением методов разделения этих веществ, по-видимому, полезно кратко описать способы расщепления молекул РНК и ДНК.

Состав продуктов гидролиза нуклеиновых кислот зависит от условий проведения реакции. Нагревание РНК или ДНК при 100 °С в 70%-ной хлорной кислоте приводит к образованию азотистых оснований [7], тогда как при действии на РНК соляной кислоты образуются пуриновые основания и пиримидиновые нуклеотиды [8], а щелочной гидролиз РНК дает смесь 3'- и 5'-рибонуклеотидов*. В случае ферментативного расщепления нуклеиновых кислот состав продуктов определяется типом использованной нуклеазы. Например, РНКаза Т₂ расщепляет молекулу РНК до 3'-рибонуклеотидов [10], а при последующем действии фосфодиэстеразы из змеиного яда образуются нуклеозиды [11]. Аналогичным образом последовательная обработка ДНК панкреатической ДНКазой I и фосфодиэстеразой из змеиного яда приводит к образованию 5'-дезоксирибонуклеотидов [11], а фосфодиэстераза из селезенки свиньи расщепляет молекулу ДНК до 3'-дезоксирибонуклеотидов [12]. Преимущество ферментативных методов расщепления нуклеиновых кислот перед химическими заключается в том, что при последующем разделении продуктов реакции с помощью ионообменной или тонкослойной хроматографии не возникает необходимости предварительно нейтрализовать смесь и удалять реагент. Кроме того, при химическом разложении разрушаются многие модифицированные углеводные остатки, обнаруженные в молекулах тРНК [13].

10.2.2. Хроматография на колонках

Молекулы главных пуриновых и пиримидиновых оснований содержат циклические атомы азота и (за исключением тимина и урацила) экзоциклические аминогруппы, которые в водной среде присоединяют ионы водорода. Следовательно, путем изменения рН раствора можно контролировать степень протонирования каждого основания. Используя этот принцип, Кон [14] показал, что главные азотистые основания элюируются 2 н. HCl с сильнокислотной катионообменной смолы в последовательности U, C, G, A, т. е. в порядке увеличения их рK_a. При более высоких значениях рН влияние заряда на порядок элюирования этих соединений быстро нивелируется и решающее значение приобретают неионные взаимодействия с сорбентом, сила которых в свою очередь зависит от формы, размеров и ароматиче-

* Основными продуктами щелочного гидролиза РНК являются 2'- и 3'-рибонуклеотиды. — *Прим. перев.*

ского характера молекул растворенного вещества. Крамптон и др. [15] показали, что в натрий-ацетатном буфере (рН 4) с той же самой катионообменной смолы (дауэкс 50) азотистые основания элюируются в другой последовательности: U, G, C, A.

Кислые ионообменные смолы на основе сульфополистирола, такие, как дауэкс 50, редко используют для разделения нуклеозидов, поскольку N-гликозидная связь пуриновых оснований с углеводным остатком чувствительна к кислотам. Альтернативный подход заключается в использовании анионообменных смол, которые представляют собой высокопористый полистирол, но в качестве функциональных групп содержат остатки четвертичных аммониевых оснований. При $\text{pH} \leq 4$ азотистые основания и нуклеозиды селективно вытесняются с этих смол [16] (этот процесс был назван «катионная эксклюзионная хроматография»), а при более высоких значениях рН их разделение подчиняется принципам анионного обмена [16, 17].

Для разделения смесей азотистых оснований и нуклеозидов, полученных при гидролизе ДНК и тРНК, недавно с успехом были использованы сорбенты с обращенной фазой — мелкозернистый силикагель, к которому ковалентно пришиты длинные алкильные остатки [18]. Смесь продуктов расщепления 1,5 мкг нуклеиновой кислоты хроматографируют на силикагеле с привитыми октадецилсилильными остатками в системе 50 мМ KH_2PO_4 — метанол (градиент концентрации метанола от 0 до 100%). Чувствительный УФ-детектор позволяет обнаружить 2—3 нмоль каждого вещества. Продолжительность анализа менее 1 ч, при этом достигается хорошее разделение сложных смесей азотистых оснований и нуклеозидов. Дальнейшее развитие метода ВЭЖХ, возможно, будет связано с использованием радиоактивных субстратов, что приведет к увеличению чувствительности обнаружения и позволит изучать биосинтез модифицированных гетероциклических оснований и нуклеозидов, присутствующих в клетке в относительно небольших количествах.

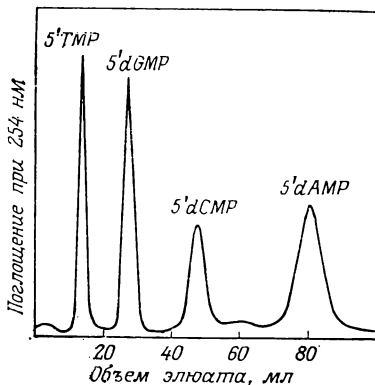
Простые нуклеотиды являются эфирами фосфорной кислоты и пуриновых или пиримидиновых нуклеозидов, и поэтому им присущи амфотерные свойства. Существует несколько изомерных форм нуклеотидов: 2'-, 3'- и 5'-нуклеозидмонофосфаты и 2',3'- и 3',5'-нуклеозидциклофосфаты [19]. Фосфатная группа нуклеотидов является своего рода «анионной рукой» молекулы, которая и обеспечивает разделение этих соединений на ионообменных колонках. Последовательность элюирования нуклеотидов определяется как неионными взаимодействиями этих молекул с сорбентом, так и величиной рН раствора. Кон и Волкин [20] осуществили разделение 2'-, 3'- и 5'-рибонуклеотидов на колонке с дауэксом 1 (в HCOO^- -форме) путем ступенчатого элюирования растворами с возрастающей концентрацией му-

равьиной кислоты и формиата натрия. Позднее было показано, что использование градиентного элюирования натрий-ацетатным буфером (рН 4) приводит к увеличению разрешающей способности колонки [21].

Находит применение также вытеснительная хроматография нуклеотидов на катионообменных смолах. Две подходящие системы для разделения смесей 2'- и 3'-рибонуклеотидов и 5'-де-

Рис. 10.1. Анион-вытеснительная хроматография 5'-дезоксирибонуклеотидов, полученных при исчерпывающем расщеплении ДНК из эритроцитов цыпленка с помощью ДНКазы I и фосфодиэстеразы из змеиного яда [14] (Г. Дж. Каулинг, неопубликованные результаты, полученные с помощью метода Блаттнера и Эриксона [22]).

Колонка: $30 \times 1,1$ см; ионит AG 50W-X4 (400 меш) в H⁺-форме (Bio-Rad, США); элюент: 0,1 М аммоний-формиатный буфер (рН 3,2); скорость потока 55 мл/ч; поглощение при 254 нм регистрировали с помощью детектора фирмы ISCO, США.



зоксирибонуклеотидов на колонках с дауэксом 50 описаны Блаттнером и Эриксоном [22] (см. рис. 10.1). ВЭЖХ на анионообменной смоле аминекс А-25 позволяет полностью разделить большинство гетероциклических оснований, нуклеозидов и нуклеотидов [23]. Этот быстрый метод анализа идеально подходит для изучения метаболизма аналогов нуклеозидов, вводимых в организм при химиотерапии рака.

10.2.3. Тонкослойная хроматография

Распределительную хроматографию на бумаге [24] или в тонком слое целлюлозы [25—27] широко использовали для определения модифицированных нуклеозидов в нуклеиновых кислотах. Входящие в состав ДНК модифицированные основания обычно обнаруживают с помощью одномерной восходящей хроматографии на бумаге [28]. Однако сложные смеси модифицированных рибонуклеозидов, найденные в молекулах тРНК [13], значительно лучше разделяются с помощью двумерной ТСХ на целлюлозе. Для элюирования смесей нуклеозидов сначала в одном направлении, а затем в другом, перпендикулярном первому, используют соответственно кислые и щелочные буферы. При УФ-облучении полученных хроматограмм каждый нуклеозид обнаруживается в виде пятна с характеристическим значением R_f [25]. Рандерас и сотр. [26, 27] предложили более чув-

ствительный радиохимический метод анализа нуклеозидов. Он основан на окислении *цис*-гликольной группировки остатков рибозы периодатом натрия. Смесь образующихся диальдегидов восстанавливают бортритидом натрия или калия до соответствующих ди- и триолов, которые разделяют с помощью двумерной ТСХ. Для обнаружения пятен используют метод низкотем-

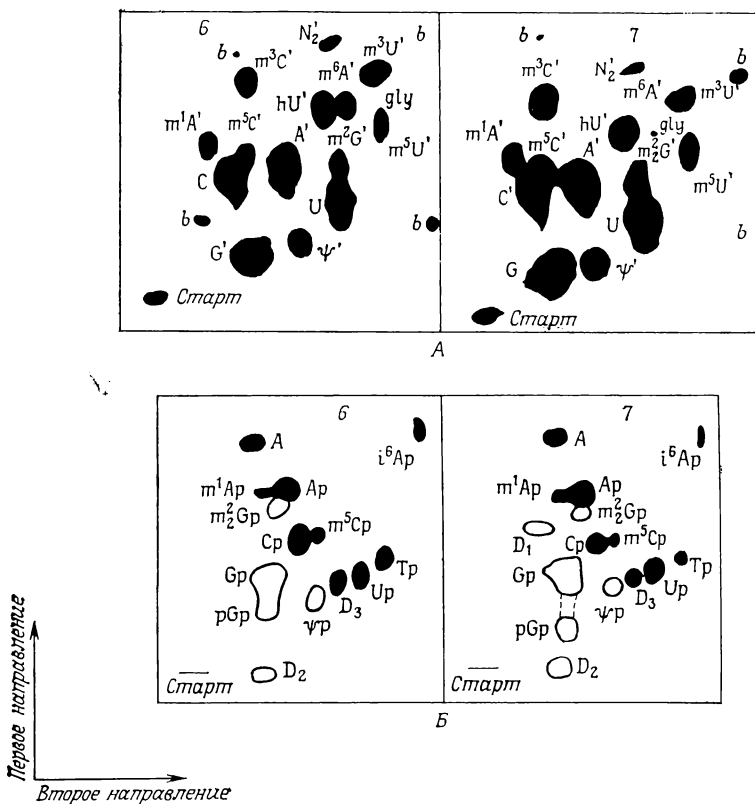


Рис. 10.2. ТСХ на целлюлозе меченных тритием производных нуклеозидов $\text{tRNA}_6^{\text{Ser}}$ и $\text{tRNA}_7^{\text{Ser}}$ из *Drosophila* (А) и нуклеотидов тех же tRNA (Б) [29] (с разрешения авторов).

А — меченные производные нуклеозидов получены по методу Рандераса и др. [26] и разделены на пластинках с целлюлозой в системах ацетонитрил — этилацетат — *n*-бутанол — изопропанол — 6 н. NH_4OH (40 : 30 : 10 : 20 : 27) (первое направление) и 2-метилбутанол-2 — метилэтилкетон — вода — муравьиная кислота (20 : 20 : 10 : 1) (второе направление). На рисунке изображена флюорограмма; фоновые пятна обозначены *b*, а глицирин — *gly*.

Б — двумерная ТСХ на целлюлозе продуктов расщепления сериновых tRNA РНКазой T_2 ; первое направление: изомасляная кислота — 0,5 М NH_4OH (5 : 3), второе направление: трет-бутанол — HCl — вода (14 : 3 : 3). Обведены участки, которые при УФ-облучении хроматограмм флуоресцировали в присутствии кислоты. Хроматографическая подвижность и спектральные свойства продукта N_p и нуклеотида m^6Ap идентичны. D_1 , D_2 и D_3 являются, вероятно, динуклеозиддифосфатами, которые образуются при гидролизе tRNA , содержащей 2-О-метилированные остатки нуклеотидов.

пературной флюорографии [27]. На рис. 10.2А представлены хроматограммы полученных таким способом меченных тритием производных рибонуклеозидов двух сериновых тРНК из *Drosophila* [29].

Условия двумерной ТСХ дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов аналогичны описанным для анализа нуклеозидов [31] (ср., например, конкретные методики анализа, приведенные в подписи к рис. 10.2). Для разделения нуклеотидов может быть использована также ионообменная хроматография в тонком слое целлюлозы, обработанной полиэтиленгликолем [25]. В этом варианте ТСХ применяется градиентное элюирование растворами солей, например хлорида лития или сульфата аммония. При анализе смесей моно-, ди- и трифосфатов в качестве элюента обычно используют 0,75 М NaH_2PO_4 [5]. Подвижность этих соединений на указанном сорбенте уменьшается с увеличением числа остатков фосфорной кислоты в их молекулах.

10.2.4. Электрофорез

Высоковольтный электрофорез на бумаге в аммоний-форматном буфере (рН 3,5) широко использовался для разделения рибонуклеотидов в одном направлении [30]. Однако с помощью этого метода, как правило, не удастся разделить 2'- и 3'-изомеры одного и того же рибонуклеозидфосфата (исключение составляют соответствующие изомеры Grp).

10.2.5. Гель-хроматография

В литературе описаны попытки использования сефадексов и биогелей, представляющих собой соответственно сшитый декстран и гранулированный полиакриламидный гель, для разделения компонентов нуклеиновых кислот за счет различного сродства их молекул к сорбенту [32, 33]. Однако в основном гель-хроматографию применяют для фракционирования нуклеиновых кислот и их компонентов в соответствии с размерами молекул этих соединений. Например, на колонке с сефадексом G-10 нуклеозиды и нуклеотиды отделяются от неорганических солей (выходят со свободным объемом колонки) [34]. Аналогичным образом олигонуклеотиды, содержащие больше 10—15 нуклеотидных остатков, не задерживаются на сефадексе G-25 или G-50, а мононуклеотиды проникают в поры геля и поэтому элюируются значительно медленнее [3]. Именно этот метод широко используют для удаления избытка нуклеозидтрифосфатов из смеси биосинтетических олиго- и полинуклеотидов [35].

10.3. Олигонуклеотиды

Полимеры нуклеозидмонофосфатов, в молекулах которых 3'- и 5'-гидроксильные группы двух соседних углеводных остатков связаны фосфодиэфирным мостиком, представляют собой ковалентный каркас нуклеиновых кислот. Соединения, содержащие менее 50 нуклеотидных остатков, обычно относят к олигонуклеотидам. Олигонуклеотиды, построенные из остатков одного и того же нуклеотида, называют гомополимерами. Их получают либо синтетическим путем, либо в результате расщепления более длинных полимеров. Этот раздел посвящен хроматографии олигонуклеотидов на колонках; фракционирование этих соединений с помощью электрофореза на бумаге и в геле рассмотрено в разд. 10.7.

10.3.1. Ионообменная хроматография

Первые попытки разделения молекул, содержащих более трех рибонуклеиновых остатков, на полистирольных анионообменных смолах оказались безуспешными из-за сильных неионных взаимодействий растворенного вещества с сорбентом. Эту проблему удалось преодолеть с помощью слабоосновных анионитов на основе целлюлозы, впервые использованных при разделении белков. Меньшая основность этих сорбентов и их высокая пористость позволили осуществить фракционирование значительно более длинных молекул. На колонках с DEAE-целлюлозой можно хроматографировать ди-, три- и тетрарибонуклеотиды, причем поведение нуклеотидов не зависит от характера входящих в их состав гетероциклических оснований [36]. Аналогичные эксперименты с использованием градиентного элюирования растворами солей показали, что фракционирование гомополимеров дезоксирибонуклеотидов, вплоть до октамеров, происходит в соответствии с размерами их молекул [37]. Введение в элюирующий буфер 7 М мочевины расширяет возможности колонок с DEAE-целлюлозой; в такой системе можно разделить олигонуклеотиды, содержащие до 15 нуклеотидных остатков [38, 39]. В нейтральной среде в присутствии мочевины нивелируются неионные взаимодействия нуклеотидов с сорбентом и подвижность молекул определяется только величиной их заряда [38]. При более низких значениях pH мочевина способствует протонированию остатков аденозина и цитидина, и поэтому одинаковые по длине, но различающиеся по составу олигонуклеотиды можно разделить на DEAE-целлюлозе при pH 2,5—4 в присутствии 7 М мочевины [40]. Использование DEAE-сефадекса, неионные взаимодействия которого с олигонуклеотидами слабо проявляются даже в отсутствие мочевины, позволяет осуществ-

лать эффективное разделение этих соединений в соответствии с размерами их молекул [40].

Предложенный Эганом и Кельмерсом [41] метод ВЭЖХ на сорбенте RPC5 был успешно использован для фракционирования олигонуклеотидов [41—43]. Этот сорбент состоит из мельчайших сферических гранул полихлортрифторэтилена, покрытых пленкой галогенидов четвертичных аммониевых оснований, в состав которых входят три длинных алкильных остатка (C_8 — C_{12}).

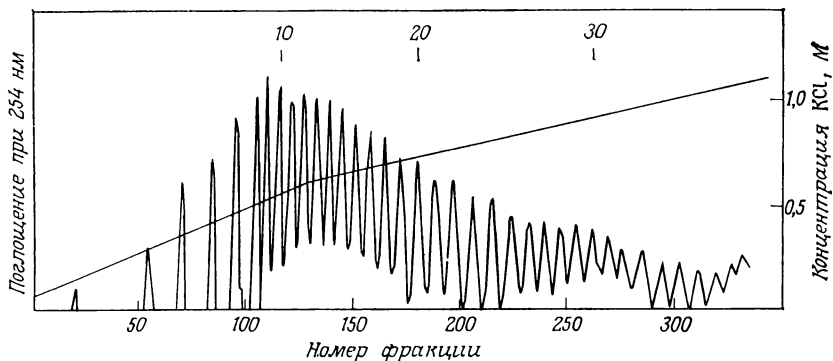


Рис. 10.3. Хроматография олигорибонуклеотидов $(A)_n$ на обращенной фазе RPC5 [43] (с разрешения авторов).

Смесь олигорибонуклеотидов, полученную при щелочном гидролизе $poly(A)$, наносили на колонку $100 \times 2,5$ см с RPC5 в 10 мМ трис—HCl-буфере (pH 8), содержащем 0,1 мМ ЭДТА; для элюирования использовали линейный градиент концентрации KCl. Указанные на рисунке значения n определены с помощью аналитического электрофореза олигонуклеотидов в 20%-ном полиакриламидном геле.

Во многих отношениях сорбент RPC5 проявляет свойства слабоосновного анионита: чем длиннее молекула олигонуклеотида, тем при более высокой концентрации противоиона он элюируется с колонки. Вместе с тем мы обнаружили, что гранулы полимера без покрытия обладают сродством к пуриновым, а не к пиримидиновым нуклеозидам. Поскольку ионообменный процесс протекает на поверхности гранул, равновесие между молекулами адсорбированного вещества и вытесняющими противоионами устанавливается быстро. Этим, по-видимому, и обусловлена высокая разрешающая способность сорбента RPC5. Порядок элюирования олигонуклеотидов с этого сорбента зависит от размеров и состава их молекул, а в некоторых случаях и от последовательности нуклеотидных остатков [43]. В отличие от анионитов на основе целлюлозы, которые имеют фибриллярную структуру и поэтому способны удерживать длинные молекулы нуклеиновых кислот, на RPC5 можно фракционировать олигонуклеотиды, существенно различающиеся по молекулярной массе, например олигорибонуклеотиды [41], тРНК (разд. 10.4), фраг-

менты ДНК (разд. 10.6.3) и гомополимеры дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов [42, 43] (рис. 10.3). Poly(Gp) и poly(dGp), которые обладают высоким сродством к полимерной подложке RPC5, можно разделить при высоких значениях pH [43].

10.4. Транспортные РНК

Транспортные РНК (тРНК) играют ключевую роль в биосинтезе белков. В каждой живой клетке присутствует от 40 до 150 различных видов этих молекул. 3'-Концевая нуклеотидная последовательность всех тРНК, первичная структура которых к настоящему времени установлена, завершается триплетом CCA_{OH}. Специфичная по отношению к данной тРНК аминокил-тРНК-синтетаза этерифицирует 3'-гидроксильную группу концевого остатка аденозина аминокислотой, которая соответствует определенному триплету нуклеотидов (антикодону) в одной из петель тРНК. Для каждой аминокислоты существует несколько тРНК, называемых «изоакцепторы». Такая множественность тРНК стимулировала поиски методов фракционирования этих соединений.

Чтобы достичь разделения тРНК, используют незначительные различия в их физических и химических свойствах. В силу того что разные тРНК несколько отличаются друг от друга по величине коэффициента распределения между двумя несмешивающимися растворителями, для их разделения пригоден метод противоточного распределения. Например, с помощью распределения между 1,25 М раствором фосфата натрия (pH 6,0), формамидом и пропанолом-2 из суммарной фракции тРНК дрожжей удалось выделить в чистом виде тРНК^{Ala} [44]. Другие методы противоточного распределения описаны в обзоре [45].

Для фракционирования тРНК широко используют анионообменную хроматографию. При низкой ионной силе тРНК, представляющие собой полианион, легко связываются с положительно заряженными группами DEAE-целлюлозы или DEAE-сефадекса. Затем тРНК можно элюировать с колонки растворами солей с высокой ионной силой [46] или в градиенте концентрации соли [47]. Первый метод обычно используют для концентрирования растворов нуклеиновых кислот. Взаимодействие тРНК с DEAE-целлюлозой обусловлено не только ионным обменом, но и образованием множества водородных связей между молекулой тРНК и матриксом целлюлозы. Сила этих вторичных взаимодействий зависит от pH среды и температуры [47].

Частичное бензоилирование или нафтоилирование гидроксильных групп приводит к существенному изменению характеристик DEAE-целлюлозы. В результате такой модификации

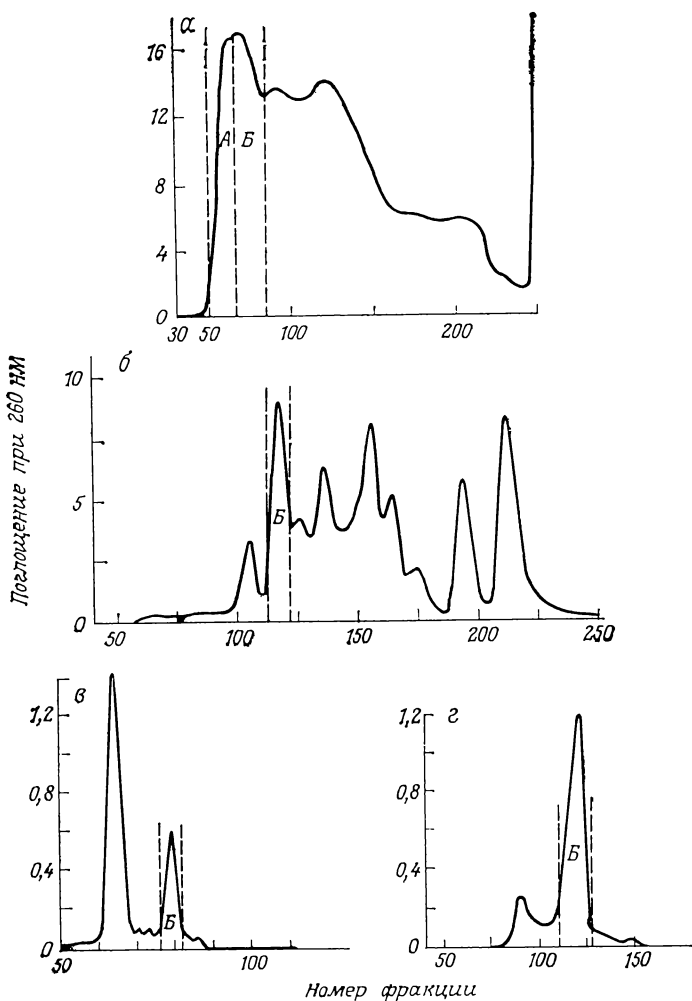


Рис. 10.4. Хроматографическая очистка инициаторной тРНК^{Met} из *Drosophila* [55] (с разрешения авторов). А и Б обозначены фракции, в которых, согласно данным аминокислотирования, присутствовала тРНК^{Met}.

а — хроматография смеси тРНК (8700 А₂₆₀) на бензоилированной DEAE-целлюлозе в 0,5 М NaCl, 10 мМ MgCl₂. Колонка: 90×1,2 см (внутр. диаметр); линейное градиентное элюирование раствором хлорида натрия (0,5→1 М), содержащим 10 мМ MgCl₂, при 20 °С.
 б — разделение компонентов объединенных фракций Б (1854 А₂₆₀) на колонке 95×1,6 см (внутр. диаметр) с сефарозой 6В в градиенте концентрации сульфата аммония (1,5 М→0).
 в — фракционирование части элюата, отвечающего зоне бБ (90 А₂₆₀), на колонке 36×2,5 см (внутр. диаметр) с RPC5 при 37 °С; градиентное элюирование раствором хлорида натрия (0,45→1,0 М) в 10 мМ трис — HCl-буфере (рН 8), содержащем 10 мМ MgCl₂.
 г — рехроматография фракции вБ на той же колонке с RPC5; градиентное элюирование раствором хлорида натрия (0,45→0,65 М) в 50 мМ натрий-форматном буфере (рН 3,5), содержащем 10 мМ MgCl₂. Полученный чистый препарат тРНК^{Met} охарактеризован по ее акцепторной способности (1510—1720 пмоль метионина на 1 ед. поглощения тРНК^{Met} при 260 нм).

меняется сродство тРНК к иониту, поскольку, во-первых, некоторые его ионизованные группы оказываются экранированными заместителями и, во-вторых, появляется возможность связывания тРНК за счет слабых селективных взаимодействий между азотистыми основаниями и введенными в молекулу целлюлозы ароматическими остатками [48]. Гиллам и сотр. [48—50] впервые приготовили бензоилированную DEAE-целлюлозу (BD-целлюлозу) и показали, что на таком сорбенте в режиме градиентного элюирования солевыми растворами можно провести фракционирование тРНК дрожжей. Молекулы тРНК, содержащие остатки липофильных нуклеозидов, достаточно прочно связываются с BD-целлюлозой, поэтому, чтобы их элюировать, в 1 М раствор хлорида натрия необходимо добавить 10% этанола или формамида. Благодаря своей высокой разрешающей способности BD-целлюлоза нашла широкое применение в качестве сорбента для фракционирования тРНК из многих биологических объектов [48—55] и для анализа смесей их изоакцепторных форм [51]. Типичная хроматограмма, полученная при фракционировании тРНК из *Drosophila* на BD-целлюлозе, приведена на рис. 10.4.

Используя свойство BD-целлюлозы преимущественно удерживать молекулы тРНК, в состав которых входят ароматические остатки, Тенер и сотр. [53, 54] разделили изоакцепторные формы этих соединений в виде производных, образующихся при ацилировании NH_2 -группы аминокислотного остатка аминоксил-тРНК N-оксисукуцинимидным эфиром 2-нафтоксисукусной или феноксисукусной кислоты. Немодифицированные тРНК смывали с BD-целлюлозы 1,2 М раствором хлорида натрия, а для элюирования производных в этот раствор добавляли 10% этанола. Удобный метод получения радиоактивно меченных иодом-125 специфических тРНК включает стадию модификации аминоксил-тРНК аналогичным активированным эфиром 3-(4'-оксифенил)пропионовой кислоты и последующую очистку полученного препарата с помощью хроматографии на BD-целлюлозе [54].

Так называемая «обращенно-фазовая» хроматография тРНК в действительности представляет собой сочетание методов распределительной и ионообменной хроматографии. Если использовать неподвижную фазу, адсорбированную на инертной матрице, а элюирование проводить в градиенте концентрации соли, то в ходе хроматографии будут непрерывно меняться коэффициенты распределения тРНК между подвижной и неподвижной фазами, т. е. таким образом в экспериментальные условия вводится дополнительный параметр. Такая методика разделения тРНК описана в работе [56]. В качестве инертного носителя авторы использовали сефадекс G-25, неподвижная водная фаза

содержала ионы K^+ , а элюирование проводили в градиенте концентрации органического амина. Хотя при таком фракционировании тРНК получены вполне удовлетворительные результаты, этот метод был заменен на другой, в котором в качестве неподвижной фазы используют несмешивающийся с водой органический растворитель, покрывающий частицы инертного носителя [57—60]. Смеси тРНК были разделены на индивидуальные компоненты путем пропускания их водных растворов через колонки с таким сорбентом. Чтобы предотвратить адсорбцию тРНК, носитель, представляющий собой промытый кислотой кизельгур, предварительно обрабатывали диметилдихлорсилом. Несколько позже в качестве инертного носителя для обращенно-фазовой хроматографии стали использовать полихлортрифторэтилен (разд. 10.3.1). Частицы такого полимера покрывают слоем нерастворимой в воде соли тетраалкиламмония с высокой молекулярной массой, выполняющего роль активного экстрагента и эффективного анионообменника.

Простая модель, описывающая подвижность тРНК на таких колонках с обращенной фазой, сводится к равновесному анионному обмену. Когда тРНК наносят на колонку в разбавленном растворе хлорида натрия, ионы Cl^- , связанные с четвертичными аммониевыми группами, обмениваются на фосфатные группы нуклеиновой кислоты. За счет электростатических взаимодействий тРНК удерживаются на колонке и их подвижность становится близкой к нулю. При более высоких концентрациях хлорида натрия в соответствии с законом действия масс ионы Cl^- связываются с четвертичными аммониевыми группами, транспортные РНК высвобождаются в подвижную фазу и элюируются с колонки. Разрешающая способность колонки зависит от температуры, присутствия двухзарядных ионов металлов, pH среды, количества тРНК в разделяемой смеси и от скорости элюирования [59]. Такие хроматографические системы широко использовались для выделения и очистки тРНК из бактерий и клеток млекопитающих [59—61]. Более высокая разрешающая способность сравнительно недавно появившихся колонок с сорбентом RPC5 обеспечила им широкое применение для анализа изоакцепторных форм тРНК. Примеры разделения тРНК с помощью хроматографии на сорбенте RPC5 показаны на рис. 10.4 и 10.5.

Для фракционирования тРНК была с успехом использована хроматография на гидроксипатите в градиенте концентрации натрий-фосфатного буфера [62—65]. Согласно теории Бернарди [66], ионы Ca^{2+} , присутствующие на поверхности кристаллов гидроксипатита, связывают специфические фосфатные группы РНК. Поэтому разделение на таком сорбенте зависит от пространственной ориентации остатков фосфорной кислоты относи-

тельно друг друга, которая в свою очередь определяется вторичной и третичной структурой РНК. Молекулы РНК с неупорядоченной вторичной структурой десорбируются при существенно более низкой концентрации фосфата [66]. С помощью хро-

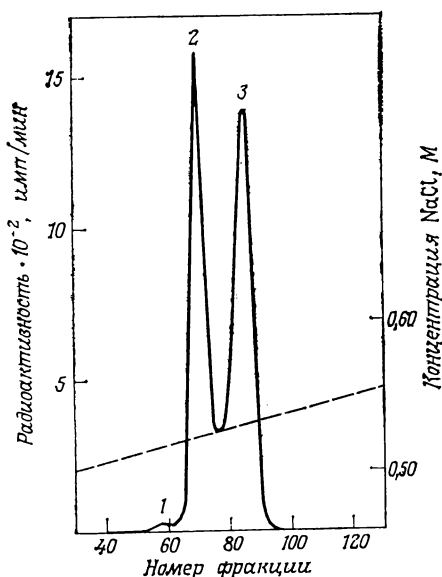


Рис. 10.5. Хроматография $[^{14}\text{C}]$ метионил-тРНК из *Drosophila* [61] (с разрешения авторов).

Колонка $14 \times 0,9$ см (внутр. диаметр); сорбент RPS5; элюент 10 мМ натрий-ацетатный буфер (рН 4,5), содержащий 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ 2-меркаптоэтанол и NaCl (профиль градиента концентрации NaCl показан пунктирной линией); температура 22 °C. Измерение радиоактивности проводили в жидкостном сцинтиллаторе аквазол.

Способность тРНК_{Met} образующейся при гидролизе метионил-тРНК_{Met} (пик 3), подвергаться аминокислотированию с участием аминокислот-тРНК-синтетазы из *E. coli* свидетельствует о том, что эта тРНК является инициатором биосинтеза белка (см. рис. 10.4).

свойствам участками молекулы тРНК, а также образованием водородных связей. С уменьшением концентрации ионов сульфата элюируются все более неполярные молекулы тРНК (рис. 10.4).

Целлюлоза, этерифицированная борной кислотой, способна связывать 2'- и 3'-гидроксильные группы 3'-концевого остатка аденозина тРНК, тогда как аминокислот-тРНК свободно проходит через колонку с этим сорбентом [72]. Однако на практике при высоких рН элюента, необходимых для образования борат-

хроматографии на гидроксиапатите удалось отделить тРНК^{Тгр} из дрожжей от соответствующей аминокислот-тРНК [67]. Недостатки гидроксиапатита как сорбента для фракционирования тРНК обусловлены некоторыми его физическими свойствами и вариабельностью хроматографических характеристик. Спенсер и сотр. [68—70] предложили способ приготовления гидроксиапатита, лишённого своих основных недостатков.

Смесь тРНК сорбируется на колонке с сефарозой, уравновешенной 1,5 М сульфатом аммония. тРНК фракционируют в режиме градиентного элюирования от 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 0 [71]. Полагают, что сорбция тРНК на сефарозе обусловлена гидрофобными взаимодействиями между неполярными алифатическими цепями геля и аналогичными по своим

ных комплексов, сложноэфирные связи аминокислотных остатков аминокислот с многими изоакцепторными формами тРНК неустойчивы, и поэтому в ходе эксперимента может меняться соотношение между количествами свободных и ацилированных тРНК. С помощью хроматографии на диоксидборатцеллюлозе можно выделить тРНК, в состав которых входят остатки псевдоуридина, содержащего *цис*-гликольную группировку [72].

Для очистки одного типа тРНК обычно необходимо несколько хроматографических стадий. После каждой стадии фракционирования тРНК^x обнаруживают путем обработки определенных алиquotных порций элюата радиоактивно меченой аминокислотой X в присутствии соответствующей аминокислот-тРНК-синтетазы; фракции, в которых присутствует искомая тРНК, объединяют и наносят на другую колонку. Эти операции проводят до тех пор, пока удельная емкость препарата (т. е. количество данной аминокислоты, которое способно связаться с тРНК, присутствующей в 1 мл раствора с поглощением, равным одной оптической единице при 260 нм) не достигнет величины, характерной для чистого образца тРНК. Пример такой тактики выделения тРНК показан на рис. 10.4. В общем случае с BD-целлюлозы, DEAE-сефадекса и ионита RPC5 тРНК элюируются в одинаковой последовательности, однако путем варьирования условий ионообменной хроматографии можно добиться разделения большинства тРНК. BD-целлюлоза и DEAE-сефадекс обладают высокой емкостью, поэтому их целесообразно использовать на начальных стадиях фракционирования тРНК. Преимущества гидроксиапатита и сефарозы СС становятся очевидными в тех случаях, когда вы имеете дело со смесью тРНК, которую невозможно разделить с помощью других видов хроматографии. Разделение на этих сорбентах осуществляется исключительно за счет неионных взаимодействий, и поэтому порядок элюирования тРНК кардинальным образом отличается от характерного для ионообменной хроматографии. Аминокислот-тРНК, особенно содержащие остатки ароматических аминокислот, в условиях анионообменной хроматографии ведут себя иначе, чем соответствующие свободные тРНК. Присутствие аминокислотного остатка часто приводит к увеличению сродства данной тРНК к иониту, и в некоторых случаях этот эффект может быть использован при выделении и очистке тРНК.

Описаны различные системы для электрофореза смесей тРНК в полиакриламидном геле. С помощью двумерного электрофореза в 16%-ном полиакриламидном геле осуществлено разделение суммарной фракции тРНК из *Escherichia coli* [73]. На полученной электрофореграмме обнаружено до 45 отчетливых пятен. Не исключено, что продолжающееся совершенствова-

ние метода гель-электрофореза, обладающего высокой разрешающей способностью, в будущем обеспечит более быстрое по сравнению с хроматографией фракционирование тРНК.

10.5. Высокомолекулярные РНК

Открытие матричной РНК (мРНК), которая выполняет роль переносчика генетической информации от ДНК к системе синтеза белка, стимулировало изучение метаболизма РНК. Суммарная фракция мРНК представляет собой гетерогенный по составу набор молекул, различающихся как длиной цепи, так и нуклеотидной последовательностью. В состав рибосом, являющихся местом биосинтеза белка, также входят особые типы РНК (рибосомальные РНК, или рРНК), которые образуют комплексы с рибосомальными белками. В соответствии с размерами молекул рРНК, характеристикой которых является коэффициент седиментации, различают три класса этих соединений: клетки прокариотов содержат 5S-, 16S- и 23S-рРНК, а большинство клеток эукариотов — 5S-, 18S- и 28S-рРНК.

Обычная анионообменная хроматография оказалась непригодной для очистки РНК, содержащих более 100—150 нуклеотидных остатков. Поэтому рибосомальные и матричные РНК обычно разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. К достоинствам этого метода относятся высокая скорость процесса и высокая разрешающая способность по отношению к одноцепочечным молекулам, различающимся по своим размерам. Аффинная хроматография основана на том, что высокая степень специфичности может быть достигнута за счет гибридизации или химических взаимодействий между молекулами РНК, находящимися в растворе, и соответствующими соединениями, ковалентно связанными с твердым носителем.

10.5.1. Аффинная хроматография

3'-Концевая нуклеотидная последовательность большинства матричных РНК эукариотов представляет собой полиаденилатную цепь, содержащую от 20 до 250 остатков аденозина. При высокой ионной силе раствора (1 M NaCl) этот участок мРНК [3'-poly(A)] может гибридизоваться с комплементарными ему небольшими фрагментами poly(dT) или poly(U), ковалентно связанными с неким хроматографическим носителем. После удаления РНК, не содержащих последовательности poly(A), путем промывания колонки концентрированными растворами солей мРНК можно элюировать раствором с низкой ионной силой (0,1 M NaCl) [35]. Для выделения мРНК были использованы колонки с oligo(dT)-целлюлозой [74, 75] и poly(U)-сефарозой

[76, 77]. С помощью нескольких циклов хроматографии на таких сорбентах получены высокоочищенные препараты poly(A)-содержащих мРНК, свободные от примеси рибосомальных РНК [78].

Ряд методов аффинной хроматографии, используемых для очистки специфических РНК, основан на химическом взаимодействии ионов ртути(II) с сульфгидрильными группами. Препараты меркурированной РНК могут быть получены либо путем обработки РНК ацетатом ртути [34], либо с помощью осуществляемой *in vitro* транскрипции ДНК в присутствии меркурированных СТР или УТР [35]. Такие производные в отличие от нативной РНК способны при низкой ионной силе прочно связываться с агарозой, содержащей сульфгидрильные группы. Чтобы смыть меркурированную РНК с колонки, достаточно в элюент добавить 2-меркаптоэтанол до концентрации 10—100 мМ [34, 35]. Хотя в ходе такого разделения и необходимо соблюдать определенные предосторожности, чтобы исключить возможность неспецифического взаимодействия между молекулами меркурированных и немеркурированных РНК [34], этот метод оказался вполне пригодным для удаления эндогенных РНК из смеси продуктов транскрипции, синтезированных *in vitro* в присутствии меркурированных нуклеозидтрифосфатов [35, 80].

В сравнительно недавно опубликованной работе [81] этот метод аффинной хроматографии использован для очистки специфических мРНК. Меркурированную бактериальную плазмиду с встроенным в нее фрагментом ДНК, кодирующим информационную РНК, которую надлежало выделить, гибридизовали с суммарной фракцией клеточных РНК и полученную смесь пропускали через колонку с тиоагарозой. При этом на колонке удерживались лишь те РНК, которые образовали гибриды с меркурированной плазмидой. Эти гибриды денатурировали путем добавления в элюент формамида или повышения температуры колонки и таким образом получали препарат чистой РНК. Наконец, меркурированную ДНК элюировали раствором, содержащим 2-меркаптоэтанол. Рив и др. [82] показали, что цепи РНК, 5'-концевой нуклеотидный остаток которых содержит γ -сульфгидрильную группу, специфически связываются с меркурированной агарозой, т. е. с помощью такого простого метода можно выделить цепи РНК, транскрипция которых инициирована *in vitro*.

10.5.2. Гель-электрофорез

Электрофоретическая подвижность вещества определяется величиной действующей на частицу суммарной электростатической силы, которая зависит от градиента потенциалов, эффек-

тивного заряда частицы (с учетом связывания противоионов и окружающих частицу зарядов) и фрикционного сопротивления. В случае нуклеиновых кислот постоянство отношения заряда молекулы к ее массе ограничивает возможность их разделения с помощью чисто электромиграционных методов, ибо при увеличении заряда молекулы на одну единицу (т. е. при увеличении длины цепи на одно нуклеотидное звено) фрикционное сопротивление также возрастает на величину, эквивалентную этому добавочному заряду, и результирующая двух сил — электростатической и силы трения — останется неизменной. Двух- и одноцепочечные формы РНК (и ДНК) сильно отличаются друг от друга по своим фрикционным свойствам, и тем не менее на практике как нативные, так и денатурированные нуклеиновые кислоты мигрируют в полиакриламидных или агарозных гелях со скоростью, пропорциональной логарифму их молекулярной массы. Это соотношение справедливо лишь для сравнительно низкомолекулярных одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот (в наименее плотном полиакриламидном геле могут мигрировать соединения с молекулярной массой не выше 10^7). При более высокой молекулярной массе размер молекул становится соизмеримым с размерами пор геля, поэтому такие соединения не могут проникнуть в матрицу и их разделение, естественно, невозможно.

В случае РНК, обладающих жесткой вторичной структурой (содержащих одно- и двухцепочечные участки), электрофоретическая подвижность в геле зависит не только от размеров их молекул, но и от их состава и нуклеотидной последовательности. Этот эффект может быть использован в практических целях, особенно при попытке разделить одинаковые по размерам, но различающиеся по нуклеотидному составу виды РНК. В этом случае можно варьировать содержание денатурирующего агента в геле либо даже вообще исключить денатурирующие факторы. С другой стороны, чтобы с помощью гель-электрофореза определить молекулярную массу РНК, необходимо предварительно разрушить ее вторичную структуру.

Метод гель-электрофореза всякий раз ставит экспериментатора перед выбором: либо, используя концентрированный гель, добиться высокого разрешения нуклеиновых кислот с относительно небольшой молекулярной массой, либо в геле низкой концентрации с невысоким разрешением разделить высокомолекулярные соединения. Поэтому для каждого конкретного набора молекул приходится принимать некое компромиссное решение. Верхний предел по молекулярной массе можно увеличить путем уменьшения концентрации сшивающего агента и (или) суммарной концентрации геля. Такой подход оказался эффективным в случае выделения и анализа матричных и рибосо-

мальных РНК [83, 84]. Этот метод позволяет с очень высокой точностью определить молекулярную массу многих видов РНК. Полной денатурации молекул РНК, особенно таких, которые весьма устойчивы в силу высокого содержания пар GC, можно добиться двумя способами: либо добавить такие денатурирующие агенты, как мочевина или формамид, в раствор РНК, гель и буфер, либо обработать РНК реагентами, которые препятствуют образованию вторичной структуры.

При гель-электрофорезе РНК в качестве денатурирующего агента обычно используют мочевину. РНК и ее фрагменты, в состав которых входит от 12 до 150 нуклеотидных звеньев, можно разделить в высокопроцентных полиакриламидных гелях, содержащих 7 М мочевину [85], а более длинные РНК (состоящие из 1500—4500 нуклеотидных звеньев) — в низкопроцентных полиакриламидных или агарозных гелях, содержащих 6 М мочевину [86, 87].

Сложные смеси РНК, имеющих одинаковую молекулярную массу, но различную нуклеотидную последовательность, можно разделить с помощью электрофореза в градиенте концентрации денатурирующего агента. Возможности этого метода продемонстрированы Гроссом и др. [88] на примере электрофоретического фракционирования гистоновых мРНК морского ежа в гелях, содержащих мочевину (рис. 10.6). Мочевина оказывает дестабилизирующее действие на систему внутримолекулярных водородных связей, а при низких значениях pH способствует протонированию остатков аденозина и цитозина. Поэтому по мере увеличения концентрации мочевины все более четко проявляется зависимость величины заряда молекул РНК от их нуклеотидного состава и размеров, и эта зависимость находит отражение в изменении подвижности молекул РНК в ходе их электрофоретического разделения.

Другим эффективным денатурирующим агентом является деионизованный формамид. Если РНК, растворенные в 98%-ном формамиде, подвергнуть электрофорезу в низкопроцентных полиакриламидных гелях, также содержащих 98%-ный формамид, то подвижность РНК будет определяться размерами их молекул [89, 90]. С помощью этого метода было осуществлено как аналитическое, так и препаративное разделение многих матричных и рибосомальных РНК [78] (рис. 10.7).

Вторичную структуру РНК можно разрушить еще в ходе приготовления образца для гель-электрофореза. Этого можно достичь с помощью ряда методов, в том числе путем обработки РНК 1,1 М формальдегидом [91—93], метилртутью [94] или 1 М раствором глиоксаля в 50%-ном водном диметилсульфоксиде при 50 °C [95, 96] (рис. 10.8). Эти реагенты обратимо взаимодействуют с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, что



Рис. 10.6. Разделение матричных РНК из *Psammecinus*, кодирующих гистоновые белки, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Использованы препараты полирибосомальной РНК, меченной тритием по остаткам уридина (радиоактивность $\sim 3 \cdot 10^5$ имп./мин). Детектирование с помощью флюорографии [88] (с разрешения авторов).

а — линейный градиент концентрации геля от 4 до 9%, температура 34 °С; б — 6%-ный полиакриламидный гель, линейный градиент концентрации мочевины от 0 до 5 М, температура 22 °С.

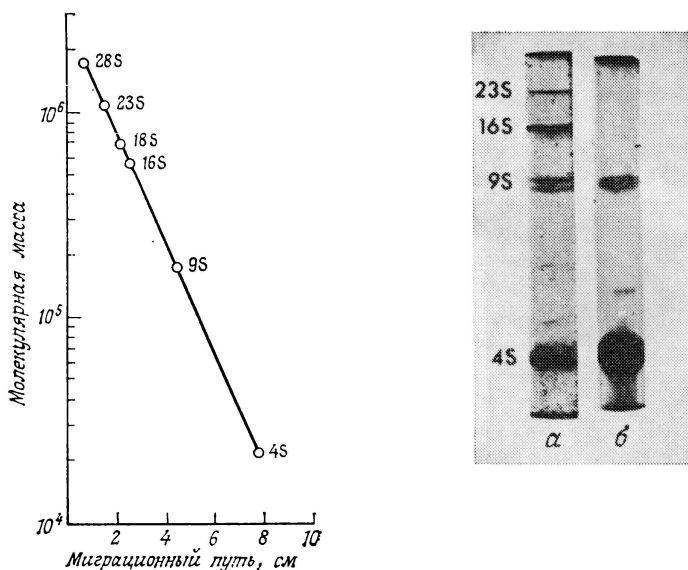


Рис. 10.7. Электрофорез рибонуклеиновых кислот в 6%-ных полиакриламидных гелях, содержащих 99%-ный формамид. Кривая зависимости электрофоретической подвижности РНК от молекулярной массы построена в полулогарифмических координатах. Используются различные рибосомальные РНК (28S, 23S 18S и 16S), мРНК глобина (9S) и тРНК (4S).

а — разделение 23S-РНК, 16S-РНК, мРНК глобина кролика и 4S-РНК в 6%-ном полиакриламидном геле, содержащем 99%-ный формамид. Видно, что мРНК α - и β -глобина отделились друг от друга.

б — разделение суммарной фракции мРНК и 4S-РНК из ретикулоцитов цыпленка в цилиндрическом геле. Оба геля окрашивали 0,02%-ным раствором метиленового голубого. (Д. Мерианка и Г. Дж. Каулинг, неопубликованные результаты.)

приводит к утрате способности последних образовывать внутри-молекулярные водородные связи.

Гель-электрофорез получил широкое распространение в качестве метода очистки биологически активных мРНК [78] и точного определения молекулярной массы РНК [97]. Недавно он был использован при анализе РНК с помощью молекулярной гибридизации [98]. По окончании электрофореза смеси РНК к определенным участкам пластинки геля прикладывали узкие полоски бумаги из диазобензилоксиметилцеллюлозы, с которой ковалентно связывались диффундирующие из геля молекулы РНК. Полученные таким образом точные копии электрофореграмм были затем использованы в экспериментах по молекулярной гибридизации с радиоактивно меченными полирибонуклеотидными или полидезоксирибонуклеотидными зондами. Гибриды, образованные связанными с активированной целлюлозой рибонуклеиновыми кислотами и молекулами меченного ^{32}P зон-

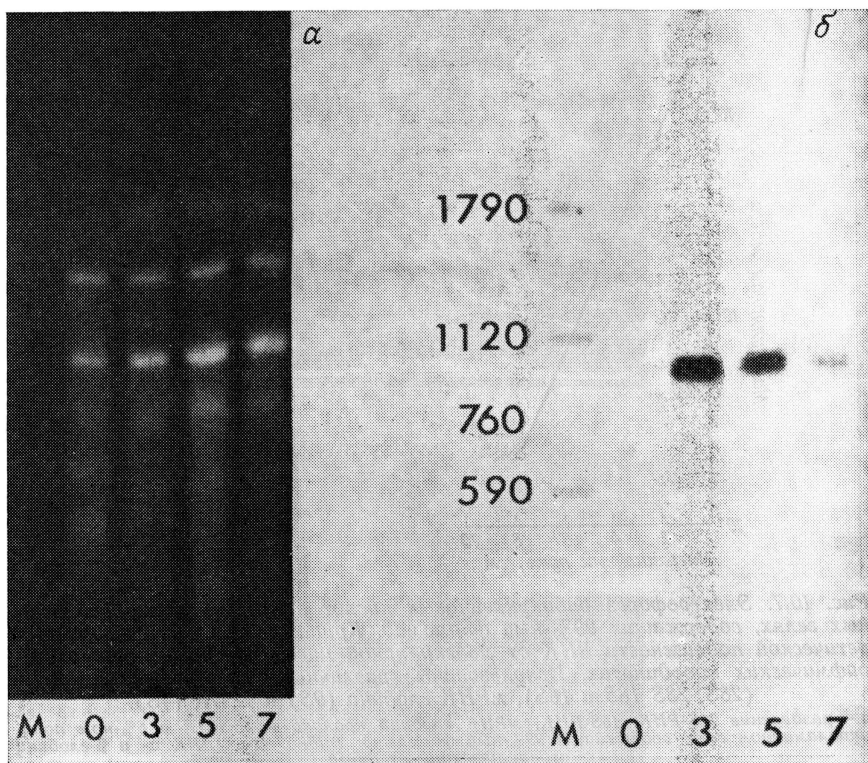


Рис. 10.8. Определение уровня одной из мРНК в клетках *Dictyostelium discoideum* с помощью гель-электрофореза в сочетании с молекулярной гибридизацией [99], (с разрешения авторов).

Цитоплазматические РНК, содержащие последовательность *rolyA*, выделяли из клеток, находящихся на различных стадиях развития (сразу после начала клеточного цикла и через 3, 5 и 7 ч), денатурировали глиоксалем [95] и подвергали электрофорезу в пластинке 1,5%-ного агарозного геля. Глиоксаль удаляли путем щелочной обработки, гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали при УФ-освещении. На приведенной фотографии (слева) наиболее интенсивные полосы отвечают 27S-рРНК (верхняя полоса) и 17S-рРНК (нижняя полоса). РНК переносили на диазобензоилксиметилцеллюлозу и гибридизовали с 32 P-меченной pDd 812 ДНК (с плазмидой, содержащей последовательности, комплементарные той мРНК, которая исчезает в ходе развития слизистых грибов). Гибриды обнаруживали с помощью радиоавтографии (рентгеновская пленка была предварительно засвечена импульсной вспышкой). Результаты представлены справа. В качестве маркеров (М) использовали набор продуктов расщепления ДНК вируса SV₄₀ рестриктазой *Hinf* I, меченных 32 P с помощью полинуклеотидкиназы T₄. Указанные размеры этих фрагментов соответствуют числу пар оснований ДНК.

да, обнаруживали с помощью радиоавтографии [98]. На рис. 10.8 показан пример использования этой методики для определения уровня мРНК на различных стадиях развития слизистых грибов [99]. В работе [100] описана аналогичная процедура выделения чистых препаратов мРНК из геля с помощью полосок нитроцеллюлозы, содержащих связанные молекулы соответствующего полидезоксирибонуклеотида.

10.6. Дезоксирибонуклеиновые кислоты

10.6.1. Хроматография на гидроксипатите

Молекулы нативной и денатурированной ДНК связываются с гидроксипатитом при низкой концентрации фосфата (0,01—0,03 М натрий-фосфатный буфер, рН 6—8). При 0,12—0,14 и 0,4—0,5 М концентрации указанного буфера элюируются соответственно одно- и двухцепочечные формы ДНК [101—104]. Присутствие других однозарядных анионов, по-видимому, не имеет значения, однако добавление в элюент мочевины и (или) детергентов, например додецилсульфата натрия, приводит к увеличению выхода высокомолекулярной ДНК. Концентрация ионов фосфата, при которой с колонки с гидроксипатитом элюируются молекулы нативной или денатурированной ДНК, не зависит от температуры. Поэтому при фракционировании на таких колонках можно использовать как процессы денатурации ДНК (т. е. разделять комплементарные цепи ДНК, денатурированной непосредственно на колонке под действием температуры или денатурирующих агентов типа формамида), так и реассоциации ДНК (образования двойной спирали из отдельных цепей ДНК). Реассоциация главным образом зависит от концентрации комплементарных цепей и, следовательно, от частоты их повторов в рассматриваемой последовательности [105]. С помощью контролируемой реассоциации ДНК генома с олигонуклеотидными зондами (фрагментами РНК или ДНК) и последующего разделения полученных гибридов на колонках с гидроксипатитом можно определить число повторяющихся или уникальных последовательностей этой ДНК [105].

10.6.2. Гель-электрофорез

Абсолютный размер молекул ДНК генома накладывает определенные ограничения на хроматографические и электрофоретические методы, которые могут быть использованы для разделения этих соединений. Даже вирусные ДНК во много раз длиннее встречающихся в природе РНК. Хромосомы большинства бактерий состоят из единственной молекулы ДНК с молекулярной массой около $3 \cdot 10^9$ (10^6 пар оснований), а молекулярная масса содержащейся в клетках животных ядерной ДНК еще на три порядка больше (молекула состоит из 10^9 пар оснований). В силу очень высокого отрицательного заряда и значительных по величине неионных взаимодействий высокомолекулярных ДНК с сорбентом разделение этих соединений с помощью анионообменной хроматографии практически невозможно. В случае гель-электрофореза также приходится сталкивать-

ся с определенными проблемами. Хотя электрофоретическая подвижность молекул ДНК в матрице геля и зависит в той или иной степени от их заряда, однако размеры пор геля не позволяют использовать этот метод для разделения больших молекул [106, 107]. Даже в гелях с наименьшей концентрацией агарозы невозможно разделить молекулы ДНК, содержащие более $(1 \div 2) \cdot 10^4$ пар оснований.

Гель-электрофорез использовали для изучения нуклеотидной последовательности ДНК генома до тех пор, пока не были открыты рестриктазы. К настоящему времени выделены сотни таких ферментов, каждый из которых узнает специфическую нуклеотидную последовательность длиной от 2 до 8 пар оснований и расщепляет двухцепочечную молекулу ДНК лишь в этом участке [108]. Точки расщепления обеих цепей ДНК могут находиться либо на одинаковом расстоянии от одного из концов молекулы (т. е. располагаться строго напротив друг друга), либо быть смещены относительно друг друга на несколько звеньев. В первом случае образуются фрагменты с «тупыми» концами, содержащие только спаренные нуклеотидные остатки, а во втором — с «липкими», которые представляют собой небольшие участки одноцепочечной ДНК. Используя рестриктазы различной специфичности, можно расщепить высокомолекулярную ДНК на отдельные фрагменты, размеры большинства из которых находятся в диапазоне, приемлемом для разделения этих фрагментов с помощью электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле [107]. Таким способом были получены уникальные фрагменты ДНК генома, которые затем были встроены в рекомбинантные ДНК-векторы [109]. Этот раздел посвящен разделению таких фрагментов.

Электрофоретическая подвижность двухцепочечных ДНК в полиакриламидном или агарозном геле пропорциональна логарифму их молекулярной массы [107]. По вышеизложенным причинам это соотношение справедливо лишь в случае фрагментов со сравнительно низкой молекулярной массой. Для электрофореза обычно используют трис-буфер с низкой ионной силой, доведенный до pH 7—8 путем добавления NaH_2PO_4 , борной или уксусной кислоты [107]. Выбор геля определяется размерами фрагментов, которые необходимо разделить. Электрофоретическое разделение фрагментов, содержащих менее 400 пар нуклеотидов, проводят в 2—10%-ных полиакриламидных гелях, фрагменты длиной в 400—1000 пар нуклеотидов разделяют в комбинированных полиакриламид-агарозных гелях, а более длинные фрагменты — в 0,5—1,0%-ных агарозных гелях [107]. Соединения, существенно различающиеся по молекулярной массе, можно разделить в градиенте концентрации полиакриламидного геля [106].

Анализ последовательности генов в ДНК стал возможным после введения в практику исследований предложенной Саузерном [110] методики переноса разделенных с помощью гель-электрофореза фрагментов ДНК на нитроцеллюлозные фильтры. Этот метод, получивший название «блоттинг по Саузерну», предшествовал описанному в разд. 10.5.2 методу переноса РНК и заключается в том, что фрагменты ДНК диффундируют из геля к поверхности нитроцеллюлозного фильтра и при нагревании последнего ковалентно связываются с ним. Затем фильтры обрабатывают ^{32}P -меченными РНК- или ДНК-зондами и продукты гибридизации этих зондов и связанных с нитроцеллюлозой фрагментов ДНК обнаруживают с помощью радиоавтографии [110]. Фрагменты ДНК могут быть также перенесены на диазобензилоксиметилцеллюлозу [111, 112], к преимуществам которой перед нитроцеллюлозой относятся возможность повторного использования фильтров и более высокая эффективность связывания небольших фрагментов ДНК. Во многих лабораториях эти методики используют с целью определить местонахождение специфических генов в ядерных ДНК [113] или изучить структуру хроматина, окружающего область активных генов [114]. На рис. 10.9 показан пример использования электрофореза в агарозном геле для разделения фрагментов ДНК и их последующего анализа с помощью метода молекулярной гибридизации.

Одно из серьезных ограничений гель-электрофореза как метода выделения специфических фрагментов ДНК заключается в том, что молекулы, имеющие примерно одинаковую массу, но различную нуклеотидную последовательность, обладают, как правило, одинаковой электрофоретической подвижностью. Один из возможных подходов к решению этой проблемы основан на использовании предложенного в работе Фишера и Лермана [115] метода двумерного гель-электрофореза фрагментов ДНК. Сначала смесь фрагментов ДНК разделяют в соответствии с их размерами с помощью обычного гель-электрофореза, а затем в перпендикулярном направлении проводят электрофорез в 4%-ном полиакриламидном геле в градиенте концентрации формамида (от 4 до 30%) и мочевины (от 0,7 до 5,25 М). Разделение проводят при повышенной температуре. В этой методике использован эффект резкого уменьшения электрофоретической подвижности в результате денатурации или плавления части нативной молекулы ДНК. В ходе электрофореза во втором направлении фрагменты ДНК подвергаются воздействию все более жестких денатурирующих условий, и плавление части молекулы двухцепочечной ДНК сопровождается скачкообразным изменением ее подвижности. Связь между подвижностью фрагментов ДНК и их нуклеотидной последовательностью носит сложный характер и до сих пор окончательно не выяснена [115],

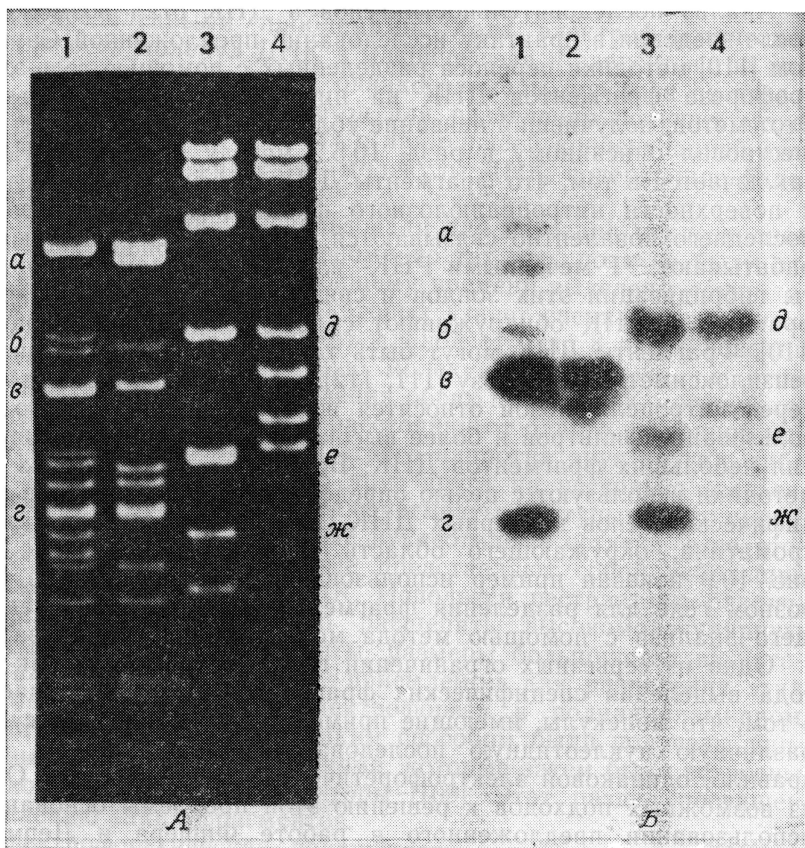


Рис. 10.9. Разделение клонированных фрагментов ДНК человека с помощью электрофореза в агарозном геле и идентификация фрагментов, содержащих участка гена β -глобина.

А — электрофореграмма продуктов расщепления ДНК λ -бактериофагов HBG1 (1, 3) и HBG3 (2, 4), содержащих встроенные фрагменты гена β -глобина человека длиной 15 000 пар оснований, рестриктазами EcoRI (1, 2) и Pst I (3, 4). Электрофорез проводили в пластинках 0,8%-ного агарозного геля в 40 мМ трис-буфере, содержащем 5 мМ ацетат натрия и 1 мМ ЭДТА и доведенном до pH 7,4 путем добавления уксусной кислоты. Для обнаружения полос гель обрабатывали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и фотографировали при УФ-освещении.

Б — результаты молекулярной гибридизации фрагментов ДНК, перенесенных на диазобензиллоксиметилцеллюлозу, с 32 P-меченной плазмидой JW102, содержащей последовательность кДНК β -глобина человека. Гибриды обнаруживали с помощью радиоавтографии (рентгеновскую пленку предварительно засвечивали импульсной вспышкой).

а—ж обозначены полосы, которые отвечают фрагментам ДНК, содержащим участки гена β -глобина.

(Клонированные λ -бактериофаги HBG1 и HBG3 любезно предоставлены Т. Маниатисом, а плазмида JW102 — Б. Форгетом.)

однако этот мощный метод исследования, позволяющий за один прием разделить до 1000 отдельных фрагментов ДНК, обладает широкими возможностями.

Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле может быть также использован для локализации участков ДНК, отвечающих 5'- и 3'-концевым последовательностям и точкам внутримолекулярного «переплетения» ядерной или вирусной РНК [116]. С этой целью продукт гибридизации РНК и ДНК обрабатывают эндонуклеазой S1, специфичной по отношению к одноцепочечным нуклеиновым кислотам, и полученные гибриды комплементарных фрагментов ДНК и РНК разделяют в соответствии с их размерами с помощью гель-электрофореза. Затем в денатурирующих условиях проводят электрофорез во втором направлении, с тем чтобы определить размер образующихся одноцепочечных фрагментов ДНК. Специфические последовательности обнаруживают с помощью «блоттинга по Саузерну» и последующей молекулярной гибридизации [116]. Одноцепочечные фрагменты ДНК можно легко разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в щелочной среде. Денатурированные образцы подвергают гель-электрофорезу в буфере, содержащем 30 мМ NaOH и 2 мМ ЭДТА [117]. По своему поведению в этих условиях электрофореза такие фрагменты похожи на одноцепочечные фрагменты РНК (разд. 10.5.2).

10.6.3. Хроматография на сорбенте RPC5

Уэллс и др. [43] положили начало использованию колоночной хроматографии на сорбенте RPC5 для фракционирования продуктов расщепления ДНК генома рестриктазами [118] и для

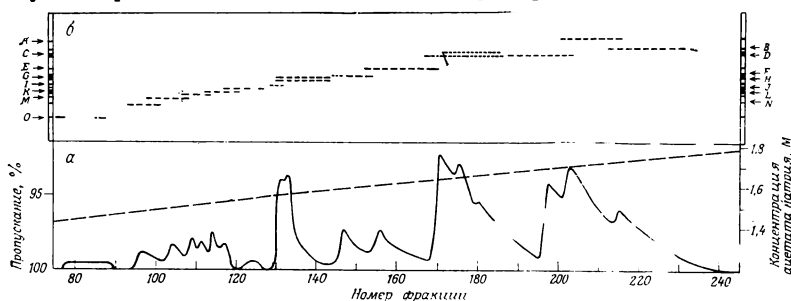


Рис. 10.10. Фракционирование продуктов расщепления pRZ2 ДНК рестриктазой HaeIII с помощью хроматографии на сорбенте RPC5 в градиенте концентраций ацетата натрия (а) и анализ полученных фракций с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (б) (из работы: Patient R. K., Hardies S. C., Wells R. D., *J. Biol. Chem.*, 254, 5542 (1976); с разрешения авторов).

На электрофореграмме сплошными линиями показаны интенсивные полосы, а пунктиром — слабые; слева и справа приведены электрофореграммы исходной смеси, А—О обозначены фрагменты в порядке уменьшения их размеров.

выделения специфических фрагментов ДНК [119] (см., например, рис. 10.10). Последовательность элюирования фрагментов ДНК в линейном градиенте концентрации соли определяется их нуклеотидным составом, первичной структурой и молекулярной массой. Оказалось, что этот метод пригоден для разделения близких по своим размерам фрагментов ДНК, не поддающихся разделению с помощью гель-электрофореза. Хроматография на сорбенте RPC5 характеризуется высоким выходом ($>80\%$) и чистотой получаемых препаратов, которые не содержат ингибирующих ферментативные реакции примесей, часто обнаруживаемых после гель-электрофореза. Если в элюент добавить гидроксид натрия до концентрации 12 мМ, то на колонках с RPC5 можно фракционировать одноцепочечные ДНК [120].

10.7. Определение нуклеотидной последовательности

Достижения в области изучения первичной структуры нуклеиновых кислот непосредственно связаны с развитием методов фракционирования олигонуклеотидов. Ускорению этих исследований способствовало наличие очищенных препаратов РНК и рибонуклеаз, специфически расщепляющих одноцепочечную молекулу РНК. К настоящему времени установлена полная нуклеотидная последовательность многих РНК, в том числе многочисленных тРНК, 5S- и 5,8S-РНК, информационных и рибосомальных РНК. Работы по определению первичной структуры ДНК начались несколько позднее, однако благодаря использованию электрофоретических методов, позволяющих быстро анализировать смеси, они вскоре достигли того же уровня, что и исследования РНК. Стратегия установления первичной структуры нуклеиновых кислот описана во многих превосходных обзорах [5, 121—123]. В настоящем разделе особое внимание уделено методам электрофореза на бумаге и в геле, используемым для разделения рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

В ранних экспериментах олигорибонуклеотиды, полученные путем расщепления очищенных тРНК рибонуклеазой, фракционировали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе [124]. Чтобы установить полную структуру тРНК, сравнивали состав и нуклеотидные последовательности двух перекрывающихся наборов олигорибонуклеотидов. Эта трудоемкая процедура позволяла определять нуклеотидную последовательность лишь небольших РНК, содержащих остатки модифицированных нуклеотидов, которые выступают в роли «структурных маркеров». Работа Сенгера [121], предложившего использовать высоковольтный ионофорез на модифицированной целлюлозе для разделения продуктов частичного гидролиза РНК ри-

бонуклеазами, положила начало совершенствованию методов фракционирования значительно более длинных олигорибонуклеотидов. Оказалось, что ионофорез на бумаге, широко использовавшийся для разделения пептидов, в случае олигорибонуклеотидов не позволяет получить удовлетворительные результаты: в этих условиях сравнительно большие олигомеры склонны

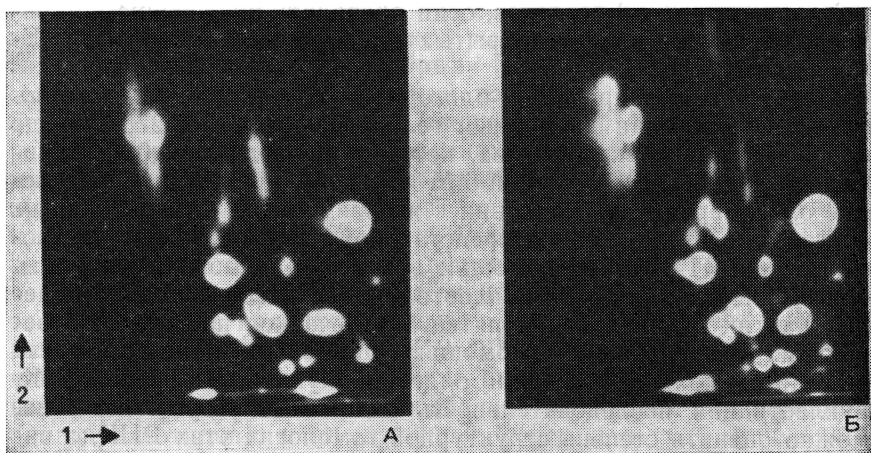


Рис. 10.11. Двумерный электрофорез на бумаге продуктов расщепления рибонуклеазой T_1 инициаторной тРНК^{Met} из *Drosophila* (А) и из печени форели (Б) (Р. Дж. Данн и Г. Дж. Каулинг, неопубликованные результаты).

В олигорибонуклеотиды, полученные после обработки выделенных тРНК рибонуклеазой T_1 , вводили радиоактивную метку (^{32}P) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Смесь подвергали ионофорезу на узких полосках ацетата целлюлозы при рН 3,5, затем олигорибонуклеотиды переносили на DEAE-целлюлозу и проводили ионофорез во втором направлении при рН 1,9. Представлены результаты обнаружения фрагментов с помощью радиоавтографии (рентгеновскую пленку предварительно засвечивали импульсной вспышкой). Сходство полученных картин разделения свидетельствует о консервативности структуры инициаторных тРНК. В работе [55] показано, что инициаторные тРНК *Drosophila* и позвоночных, состоящие из 75 рибонуклеотидных остатков, различаются лишь в шести положениях.

мигрировать в виде широких перекрывающихся зон. Четкого разделения ди-, три- и тетрарибонуклеотидов можно достичь с помощью ионофореза на ацетате целлюлозы при рН 3,5 в одном направлении и последующего ионофореза в перпендикулярном направлении на DEAE-целлюлозе при рН 1,9 [125] (рис. 10.11).

Проблемы, связанные с разделением длинных олигорибонуклеотидов, были решены Браунли и Сенгером [126], которые ввели в практику исследований метод, известный под названием «гомохроматография». Суть этого метода заключается в том, что после фракционирования олигорибонуклеотидов с помощью ионофореза на ацетате целлюлозы ^{32}P -меченные олигомеры переносят на лист бумаги из DEAE-целлюлозы и хроматографи-

руют в системе, содержащей смесь немеченых олигонуклеотидов (обычно используют неочищенный гидролизат РНК), которые выступают в роли противоионов в процессе вытеснения из участков связывания ионитом таких же по размерам или более коротких молекул более длинными молекулами. Гомохроматография на DEAE-целлюлозе позволяет разделить молекулы, содержащие до 25 рибонуклеотидных остатков. Этот предел можно увеличить до 50 остатков, если проводить разделение на тонкослойных пластинках, покрытых смесью целлюлозы и DEAE-целлюлозы [126].

Для фракционирования олигорибонуклеотидов может быть также использован двумерный гель-электрофорез [127]. В ходе первой стадии электрофореза, которую проводят в 0,025 М лимонной кислоте, содержащей 6 М мочевины, происходит разделение олигомеров в соответствии с их размерами и нуклеотидным составом, а вторая стадия представляет собой обычный электрофорез при pH 8 [127]. С помощью этого метода можно разделить олигомеры длиной до 80 нуклеотидных остатков. Путем сравнения картин распределения пятен («отпечатков пальцев»), отвечающих разделенным с помощью двумерного электрофореза [и (или) гомохроматографии] олигорибонуклеотидам двух РНК, нуклеотидная последовательность одной из которых известна, можно оценить степень структурной гомологии этих РНК, а затем отобрать для дальнейшего анализа лишь такие олигорибонуклеотиды второй РНК, которые по подвижности не совпадают ни с одним из фрагментов РНК с известной структурой (рис. 10.11).

Разделив продукты исчерпывающего или частичного гидролиза РНК с помощью рибонуклеазы, структуру большинства РНК устанавливают путем сравнения нуклеотидных последовательностей перекрывающихся фрагментов. Каждый индивидуальный олигорибонуклеотид подвергают частичному гидролизу с помощью менее специфичной рибонуклеазы (например, с помощью рибонуклеазы T₂), которая расщепляет все фосфодиэфирные связи. Реакцию проводят в таких условиях, чтобы получить набор фрагментов, различающихся по длине на один нуклеотидный остаток. С помощью двумерной гомохроматографии на пластинках с DEAE-целлюлозой разделяют эти продукты и по характеристическому изменению подвижности «укороченных» на одно звено фрагментов судят о природе нуклеотидного остатка, который в исходном олигорибонуклеотиде занимал соответствующее положение. Таким образом можно «прочитать» всю хроматограмму и установить полную нуклеотидную последовательность данного олигорибонуклеотида [5, 128].

Методики определения нуклеотидной последовательности ДНК (как, впрочем, и более новые по сравнению с вышеописан-

ной методики секвенирования РНК) также включают стадию получения наборов одноцепочечных фрагментов, различающихся по длине на один нуклеотидный остаток. Получают четыре серии фрагментов, каждый из которых оканчивается определенным нуклеотидом. Этого можно достичь с помощью двух подходов: либо на матрице одноцепочечной ДНК синтезировать вторую цепь в присутствии небольших количеств аналогов нуклеотидов («терминаторов» цепи), таких, как дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, встраивание которых в растущую полинуклеотидную цепь приводит к ее обрыву [129—131], либо с помощью селективных химических реакций разорвать полинуклеотидную цепь ДНК по определенным звеньям [132]. В обоих случаях реакцию проводят в таких условиях, чтобы в среднем степень модификации составляла один остаток на одну полинуклеотидную цепь. Аналогичные методы получения наборов олигорибонуклеотидов включают гидролиз РНК в воде при 80 °С [27] или расщепление с помощью специфических рибонуклеаз [133, 134].

Эти олигонуклеотидные фрагменты разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, обладающего высокой разрешающей способностью [129, 135] (рис. 10.12). Чтобы исключить возможность образования внутримолекулярных вторичных структур (этот процесс особенно характерен для длинных олигонуклеотидов), в электродный буфер и в гель добавляют мочевины, выполняющую роль денатурирующего агента. При разработке этих систем гель-электрофореза было отмечено, что длина нуклеотидной последовательности, поддающейся прочтению непосредственно с помощью электрофореграммы, определяется разрешающей способностью метода электрофореза, которая в свою очередь зависит от толщины геля. В случае гелей толщиной 1—2 мм на радиоавтограмме обнаруживаются диффузные полосы, поскольку радиоактивный источник (фрагменты ДНК) весьма удален от поверхности рентгеновской пленки. Более тонкие гели (0,1—0,4 мм) позволяют достичь очень высокого разрешения олигонуклеотидов и обладают к тому же дополнительным преимуществом, которое заключается в том, что за счет тепла, выделяющегося в ходе электрофореза, происходит полная денатурация петель, обогащенных GC-парами [129, 135].

10.8. Нуклеопротеиды

Многие белки способны распознавать определенные участки нуклеиновых кислот и специфически взаимодействовать с этими участками. Таким взаимодействиям принадлежит ведущая роль в процессах репликации ДНК, экспрессии генов, созревания РНК и биосинтеза белков. Молекулы ДНК и РНК в течение

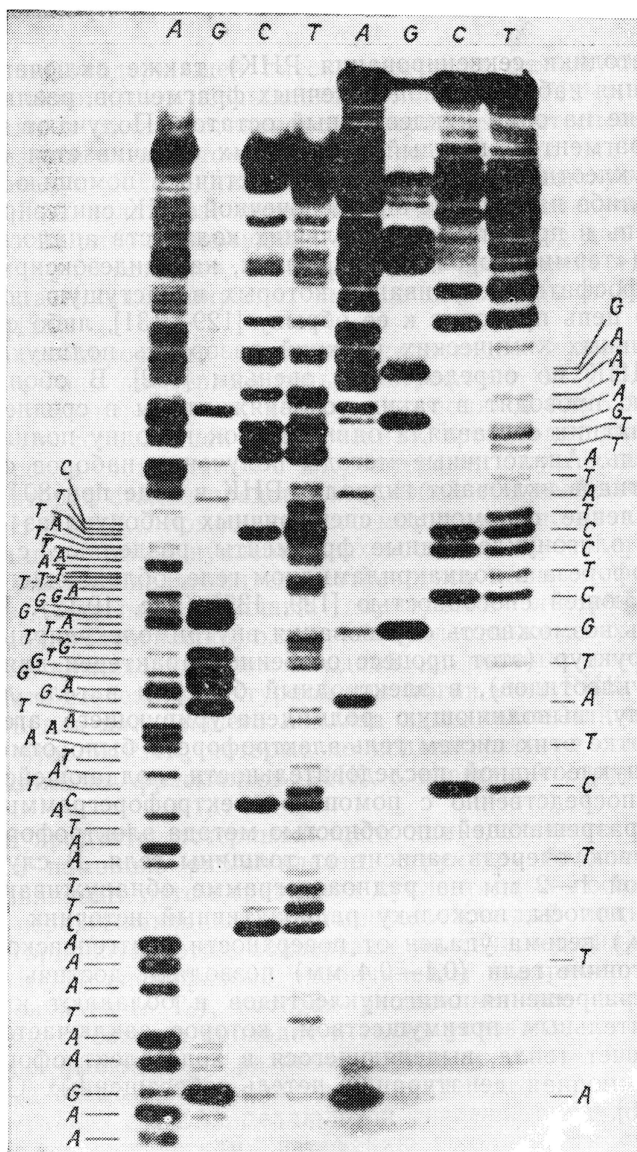


Рис. 10.12. Определение первичной структуры колициновых областей ДНК Col E1 с помощью метода Максама и Гилберта [132] (из работы [149] с разрешения авторов). Нуклеотидные последовательности каждой из этих двух областей приведены слева и справа от электрофореграммы. Буквы в верхней части рисунка (A, G, C, T) указывают, дезоксианалог какого нуклеотида использован в данном эксперименте в качестве «терминатора» (см. текст).

большей части времени их жизни в клетке представлены в виде комплексов с белками, которые обеспечивают существование этих молекул в функционально активной форме. Характерной чертой первых этапов исследования метаболизма нуклеиновых кислот было описание химических и биологических свойств этих молекул, а позднее молекулярные биологи направили свои усилия на выяснение структурной организации и функции нуклеопротеидов с целью подойти к решению проблем, связанных с репликацией и экспрессией генов. Существующие хроматографические и электрофоретические методы разделения нуклеиновых кислот оказали неоценимую помощь при исследовании строения нуклеопротеидов. Другие методы разделения в свою очередь позволили провести анализ сложных смесей нуклеопротеидов, направленный на установление первичной структуры белков и нуклеиновых кислот.

10.8.1. Структура хроматина

В ядрах клеток всех эукариотов ДНК присутствуют в виде ассоциатов с гистоновыми белками. Эти ассоциаты, или хроматиновые фибриллы, представляют собой надмолекулярную структуру, повторяющимся элементом которой является частица, называемая нуклеосомой. Каждая нуклеосома состоит из восьми гистонов (по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4) и включает участок «намотанной» на этот белковый октамер нити ДНК длиной в 140 нуклеотидных пар. Продолжение этой нити образует перемычку со следующей нуклеосомой. В зависимости от того, какому организму или какой ткани этого организма принадлежит данная клетка, перемычка между нуклеосомами может содержать от 0 (дрожжи) до 100 (сперма морского ежа) нуклеотидных пар. Стафилококковая нуклеаза расщепляет молекулу ДНК в области перемычек с образованием фрагментов, длина которых кратна длине участка ДНК, входящего в состав нуклеосомы [136]. После отделения от белков эти фрагменты можно разделить с помощью электрофореза в агарозном геле и таким образом обнаружить различия в структуре повторяющегося звена хроматина (рис. 10.13, А). При обработке хроматина ДНКазой I нуклеосомальная ДНК расщепляется на фрагменты, содержащие в среднем $10,4n$ нуклеотидных пар (n — целое число) [137]. Эти сравнительно более короткие фрагменты ДНК можно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 10.13, Б).

Изучение кинетики расщепления хроматина нуклеазами и анализ смеси образующихся продуктов с помощью гель-электрофореза по-прежнему остаются основными подходами к выяснению структурной организации нуклеопротеидов ядер эукарио-

тов и установлению структурных требований, соблюдение которых необходимо для активной экспрессии генов [138].

Гаррард и сотр. [139—142] разработали методы гель-электрофореза, позволяющие выявлять различия в составе популяций мононуклеосом. Сначала целые нуклеосомные частицы разде-

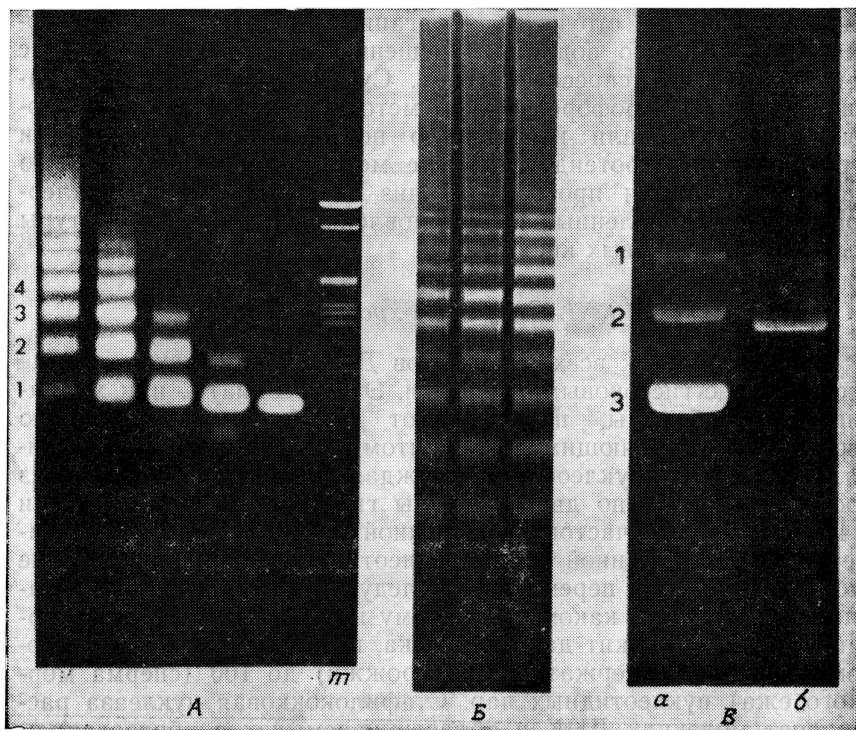


Рис. 10.13. Гель-электрофорез как инструмент исследования хроматина.

А — хроматин эритроцитов цыпленка подвергали воздействию нуклеазы из микрококков (2 ед./мл) в течение 0,5, 1, 2, 2,5 и 10 мин при 37 °С (дорожки слева направо). Образовавшиеся фрагменты ДНК выделяли с помощью экстракции фенолом и разделяли в пластинке 1%-ного агарозного геля, содержащего 30 мМ трис, 36 мМ NaH_2PO_4 и 1 мМ ЭДТА (рН 7,5). Для обнаружения полос гель обрабатывали раствором бромистого этидия и фотографировали при УФ-освещении. Полосы, отвечающие моно-, ди-, три- и тетра-нуклеосомам, обозначены 1—4; т — электрофореграмма продуктов расщепления РМ2 ДНК рестриктазой *Hae* III; длина этих фрагментов-маркеров, выраженная в виде числа пар оснований, составляет (сверху вниз): 1860, 1760, 1410, 890, 845, 672, 615, 525, 333, 295, 272, 167, 152, 120 и 95. (Дж. Аллан, неопубликованные результаты.)

Б — электрофорез фрагментов ДНК, полученных путем расщепления хроматина эритроцитов цыпленка с помощью ДНКазы I, в пластинке 10%-ного полиакриламидного геля, содержащего 40 мМ трис, 20 мМ NaOAc , 2 мМ ЭДТА и 7М мочевины (рН 7,8). Ступенчатый характер полученной картины разделения обусловлен тем, что ДНКазы I расщепляет нуклеосомальную ДНК на фрагменты, различающиеся по длине на 10 нуклеотидных пар. (Дж. Аллан, неопубликованные результаты.)

В — электрофорез плазмиды *PBr* 322 *E. coli* (а) и продукта ее расщепления рестриктазой *Bam* HI (б) в пластинке 0,8%-ного агарозного геля: 1, 2 и 3 — соответственно релаксированная кольцевая, линейная и сверхспирализованная формы. (Д. Салливан, неопубликованные результаты.)

ляют с помощью электрофореза в столбиках полиакриламидного геля в буфере с низкой ионной силой, а затем ДНК и (или) белковые компоненты различных фракций нуклеосом анализируют с помощью двумерного электрофореза в пластинках геля в присутствии детергента, обычно додецилсульфата натрия [139, 140]. В первом направлении моно- или олигонуклеосомы мигрируют в виде отдельных нуклеопротеидных комплексов, тогда как во втором направлении белки и ДНК мигрируют независимо друг от друга. Чтобы на основании данных электрофореза можно было судить о структуре участков хроматина, моно- или полинуклеосомы до стадии разделения их компонентов во втором направлении подвергают воздействию нуклеаз. Это осуществляют путем введения в первый гель и буфер обратимо инактивируемой нуклеазы из микрококков или ДНКазы I, которые по окончании электрофореза можно реактивировать, поместив гель в буфер, содержащий соответствующие двухзарядные катионы. Такая методика позволяет определить длину участков ДНК, входящих в состав нуклеосом, или длину перемычек между нуклеосомами. С помощью этого метода были изучены различные классы монопонуклеосом [139], в том числе и нуклеосомы, содержащие гистон H1 [140—142].

Для локализации участков связывания отдельных гистонов с нуклеосомальной ДНК использован другой метод двумерного гель-электрофореза [143, 144]. С этой целью аминокислотные остатки различных гистонов сшивают с частично денатурированной ДНК (реакцию проводят в нейтральной среде), затем расщепляют цепь ДНК по модифицированным нуклеотидным звеньям (при этом 5'-концевой фрагмент ДНК оказывается связанным с гистоном) и полученные таким образом сшитые нуклеопротеиды разделяют в соответствии с размерами их молекул с помощью электрофореза в пластинках 7%-ного полиакриламидного геля. До стадии электрофореза в перпендикулярном направлении ДНК или белок подвергают исчерпывающей деградации (белок расщепляют с помощью протеиназы K). Поскольку для такого рода экспериментов используют препараты радиоактивно меченных нуклеосом, получают два типа автордиограмм, отражающих соответственно картины ^{125}I -меченных гистонов и ^{32}P -меченных фрагментов ДНК. Первая из них позволяет идентифицировать гистоны, контактирующие с ДНК, а с помощью второй определяют размеры фрагментов ДНК, связанных с каждым из гистонов, и, следовательно, взаимное расположение гистонов относительно друг друга в нуклеосоме. На основании полученных результатов создают карты участков связывания каждого гистона с нуклеосомальной ДНК.

Электрофорез в агарозном геле оказался ценным методом определения конформационного состояния молекул кольцевых

ДНК. На рис. 10.13, В видно, что линейная, релаксированная кольцевая и сверхспирализованная формы плазмидной ДНК явно различаются по своей электрофоретической подвижности. В некоторых лабораториях этот метод уже использован для выявления корреляционных зависимостей между степенью сверхспирализации ДНК и скоростью репликации [145] и транскрипции [146]. Имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о том, что конформация ДНК может играть важную роль в обоих этих процессах.

Недавно было показано, что нуклеопротеиды [147] и другие белки [148], разделенные с помощью гель-электрофореза, можно перенести на нитроцеллюлозные или диазобензилоксиметилцеллюлозные фильтры. Более того, белки после такой процедуры сохраняют способность связываться с ДНК [148]. С помощью этого метода, по-видимому, можно выделить и охарактеризовать белки, взаимодействующие с ДНК или РНК. В работе [149] показано, что *lac*-репрессор из *E. coli* специфически удерживается на колонке с диазобензилоксиметилцеллюлозой, содержащей ковалентно связанные фрагменты *lac*-оператора *E. coli*. В отличие от электрофоретического разделения, которое требует соблюдения весьма специфических условий, этот тип аффинной хроматографии идеально подходит для изучения влияния ионной силы, pH и температуры на эффективность взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. Такого рода аффинную хроматографию, вероятно, можно использовать для очистки белков, контролирующих экспрессию генов.

Быстрое распространение хроматографических и электрофоретических методов в области исследования нуклеиновых кислот, которому в значительной степени способствовало становление «технологии» рекомбинантных ДНК, продолжается и по сей день, особенно в таких направлениях, как разделение мРНК, фрагментов ДНК и нуклеопротеидов. Уже установлена первичная структура обширных участков генома многих животных, и непрерывное совершенствование метода гель-электрофореза, обладающего высоким разрешением, в сочетании с использованием компьютерной техники для определения полных нуклеотидных последовательностей позволит добиться еще более значительных успехов. На ранних этапах развития этой области исследований одна из задач экспериментатора заключалась в том, чтобы приспособить используемые в других областях науки хроматографические и электрофоретические методы для разделения моно- и олигонуклеотидов. Теперь же, по прошествии тридцати лет, биохимия нуклеиновых кислот сама стала тем источником новых представлений о разделении макромолекул, который стимулирует развитие хроматографии и электрофореза.

Литература

1. *Davidson J. N.* The Biochemistry of the Nucleic Acids, 7th Edn. — London: Chapman and Hall, 1976; есть перевод раннего издания: *Дэвидсон Дж.* Биохимия нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1976.
2. *Watson J. D.* Molecular Biology of the Gene, 3rd Edn. — London: Benjamin, 1976; есть перевод более раннего издания: *Уотсон Дж.* Молекулярная биология гена. — М.: Мир, 1967.
3. *Fischer L.* — In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1, Part II, An Introduction to Gel Chromatography./Eds. Work T. S., Work E. — Amsterdam: Elsevier, 1969.
4. *Peterson E. A.* — In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 2, Part II, Cellulosic Ion Exchangers./Eds. Work T. S., Work E. — Amsterdam: Elsevier, 1970.
5. *Brownlee G. G.* — In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 3, Part I, Determination of Sequences in RNA./Eds. Work T. S., Work E. — Amsterdam: Elsevier, 1972.
6. *Gould H., Matthews H. R.* — In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 4, Part II, Separation Methods of Nucleic Acids and Oligonucleotides./Eds. Work T. S., Work E. — Amsterdam: Elsevier, 1976.
7. *Marshak A., Vogel H. J.* J. Biol. Chem., **189**, 597 (1951).
8. *Bjork G., Svensson I.* Biochim. Biophys. Acta, **138**, 430 (1967).
9. *Zamir A., Holley R. W., Marquisee M. J.* Biol. Chem., **240**, 1267 (1965).
10. *Leder P., Nirenberg M.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **52**, 420 (1964).
11. *Miyazawa Y., Thomas C. A. J.* Mol. Biol., **11**, 223 (1965).
12. *Josse J., Kaiser A. D., Kornberg A.* J. Biol. Chem., **236**, 864 (1961).
13. *Barrell B. G., Clark B. F. C.* (Editors), Handbook of Nucleic Acid Sequence. — Oxford, Joynson-Bruvvers, 1974.
14. *Cohn W. E.* Science, **109**, 377 (1949).
15. *Crampton C. F., Frankel F. R., Benson A. M., Wade A.* Anal. Biochem., **1**, 249 (1960).
16. *Singhal R. P., Cohn W. E.* Biochemistry, **12**, 1532 (1973).
17. *Singhal R. P., Cohn W. E.* Anal. Biochem., **45**, 585 (1972).
18. *Mischke C. F., Wickstrom E.* Anal. Biochem., **105**, 181 (1980).
19. *Lipkin D., Markham R., Cook W. H. J.* Amer. Chem. Soc., **81**, 6075 (1959).
20. *Cohn W. E., Volkin E.* Nature (London), **167**, 483 (1951).
21. *Anderson N. G., Green J. G., Barber M. L., Ladd C. F.* Anal. Biochem., **6**, 153 (1963).
22. *Blattner F. R., Erickson H. P.* Anal. Biochem., **18**, 220 (1967).
23. *Nissinen E.* Anal. Biochem., **106**, 497 (1980).
24. *Lane B. G.* Biochim. Biophys. Acta, **72**, 110 (1963).
25. *Randerath K., Stuck H. J.* Chromatogr., **6**, 365 (1961).
26. *Randerath E., Yu C.-T., Randerath K.* Anal. Biochem., **48**, 172 (1972).
27. *Randerath K., Gupta R. C., Randerath E.* Methods Enzymol., **65**, 638 (1980).
28. *Vanyushin B. F., Tkachev S. G., Belozersky A. N.* Nature (London), **225**, 948 (1970).
29. *White B. N., Dunn R., Gillam I., Tener G. M., Armstrong D. J., Skoog F., Frihart C. R., Leonard N. J.* J. Biol. Chem., **250**, 515 (1975).
30. *Смит Дж.* — В кн.: Нуклеиновые кислоты. Химия и биология./Ред. Чаргафф Э., Дэвидсон Дж. — М.: ИЛ, 1957.
31. *Nishimura S.* — In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 12./Eds. Davidsson J. N., Cohn W. E. — New York: Academic Press, 1972, p. 50.
32. *Braun R.* Biochim. Biophys. Acta, **149**, 601 (1967).

33. Carrara M., Bernardi G. *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 1 (1968).
34. Dale R. M. K., Martin E., Livingston D. C., Ward D. C. *Biochemistry*, **14**, 2447 (1975).
35. Gould H. J., Maryanka D., Fey S. J., Cowling G. J., Allan J. — In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 19, Chromatin and Chromosomal Protein Research, IV./Eds. Stein G., Stein J., Kleinsmith L. J. — New York: Academic Press, 1978, p. 387.
36. Staehelin M. *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 11 (1961).
37. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H. *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 6223 (1958).
38. Tomlinson R. V., Tener G. M. *Biochemistry*, **2**, 697 (1963).
39. Khorana H. G., Connors W. J. *Biochem. Prep.*, **11**, 113 (1966).
40. Tener G. M. *Methods Enzymol.*, **12**, 398 (1967).
41. Egan B. Z., Kelmers A. D. *Methods Enzymol.*, **29**, 469 (1974).
42. Dodgson J. B., Wells R. D. *Biochemistry*, **16**, 2367 (1977).
43. Wells R. D., Hardies S. C., Horn G. T., Klein B., Larson J. E., Neuen-dorf S. K., Panayotatos N., Patient R. K., Selsing E. *Methods Enzymol.*, **65**, 327 (1980).
44. Doctor B. P., Apgar J., Holley R. W. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1117 (1961).
45. Ayad S. R. *Techniques of Nucleic Acid Fractionation*. — London: Wiley-Interscience, 1972, p. 85.
46. Kawade Y., Okamoto T., Yamamoto Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 200 (1963).
47. Cherayil J. D., Bock R. M. *Biochemistry*, **4**, 1174 (1965).
48. Gillam I., Millward S., Blew D., von Tigerstrom M., Wimmer E., Tener G. M. *Biochemistry*, **6**, 3043 (1967).
49. Gillam I., Blew D., Warrington R. C., von Tigerstrom M., Tener G. M. *Biochemistry*, **7**, 3459 (1968).
50. Gillam I. C., Tener G. M. *Methods Enzymol.*, **20**, 55 (1971).
51. White B. N., Tener G. M. *Anal. Biochem.*, **55**, 394 (1973).
52. White B. N., Tener G. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 267 (1973).
53. White B. N., Tener G. M. *Can. J. Biochem.*, **51**, 896 (1973).
54. Tener G. M., Delaney A. D., Grigliatti T. A., Cowling G. J., Gillam I. C. *Biochemistry*, **17**, 741 (1978).
55. Silverman S., Heckman J., Cowling G. J., Delaney A. D., Dunn R. J., Gillam I. C., Tener G. M., Söll D., RajBhandary U. L. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 421 (1979).
56. Muench K. H., Berg P. *Biochemistry*, **5**, 970 (1966).
57. Kelmers A. D., Novelli G. D., Stulberg M. P. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3979 (1965).
58. Kelmers A. D. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3540 (1966).
59. Kelmers A. D., Weeren H. O., Weiss J. F., Pearson R. L., Stulberg M. P., Novelli G. D. *Methods Enzymol.*, **20**, 9 (1971).
60. Waters L. C., Novelli G. D. *Methods Enzymol.*, **20**, 39 (1971).
61. White B. N., Tener G. M., Holden J., Suzuki D. T. *Dev. Biol.*, **33**, 185 (1973).
62. Kothari R. M., Shankar V. J. *Chromatogr.*, **98**, 449 (1974).
63. Pearson R. L., Kelmers A. D. *J. Biol. Chem.*, **241**, 767 (1966).
64. Schofield P. *Biochemistry*, **9**, 1694 (1970).
65. Muench K. H. — In: *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. 2/Eds. Davidson J. N., Cohn W. E. — New York: Academic Press, 1971, p. 515.
66. Bernardi G. *Nature (London)*, **206**, 779 (1965).
67. Muench K. H. *Biochemistry*, **8**, 4880 (1969).
68. Spencer M., Grynpas M. J. *Chromatogr.*, **166**, 423 (1978).
69. Spencer M. J. *Chromatogr.*, **166**, 435 (1978).
70. Spencer M., Neave E. J., Webb N. L. *J. Chromatogr.*, **166**, 447 (1978).

71. Holmes W. M., Hurd R. E., Reid B. R., Rimerman R. A., Hatfield G. W. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **72**, 1068 (1975).
72. McCutchan T. F., Gilham P. T., Söll D. Nucleic Acids Res., **2**, 853 (1975).
73. Varricchio F., Ernst H. J. Anal. Biochem., **68**, 485 (1975).
74. Astell C., Smith M. J. Biol. Chem., **246**, 1944 (1971).
75. Aviv H., Leder P. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **69**, 1408 (1972).
76. Lindberg U., Persson T. Eur. J. Biochem., **31**, 246 (1972).
77. Adesnik M., Salditt M., Thomas W., Darnell J. E. J. Mol. Biol., **71**, 21 (1972).
78. Taylor J. M. Ann. Rev. Biochem., **48**, 681 (1979).
79. Dale R. M. K., Ward D. C. Biochemistry, **14**, 2458 (1975).
80. Weinmann R., Aiello L. O. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **75**, 1662 (1978).
81. Longacre S., Mach B. Methods Enzymol., **69**, 192 (1979).
82. Reeve A. E., Smith M. M., Pigiet V., Huang R. C. C. Biochemistry, **16**, 4464 (1977).
83. Peacock A. C., Dingman C. W. Biochemistry, **7**, 668 (1968).
84. Leoning U. E. Biochem. J., **113**, 131 (1969).
85. Maniatis T., Efstratiadis A. Methods Enzymol., **65**, 299 (1980).
86. Reijnders L., Sloof P., Sival J., Borst P. Biochim. Biophys. Acta, **324**, 320 (1973).
87. Rosen J. M., Woo S. L. C., Holder J. W., Means A. R., O'Malley B. W. Biochemistry, **14**, 69 (1975).
88. Gross K., Probst E., Schaffner W., Birnstiel M. Cell, **8**, 455 (1976).
89. Pinder J. C., Staynov D. Z., Gratzer W. B. Biochemistry, **13**, 5373 (1974).
90. Staynov D. Z., Pinder J. C., Gratzer W. B. Nature (New Biol.), **235**, 108 (1972).
91. Boedtker H. Biochim. Biophys. Acta, **240**, 448 (1971).
92. Schwinghamer M. W., Shepherd R. J. Anal. Biochem., **103**, 426 (1980).
93. Rave N., Crkvenjakov R., Boedtker H. Nucleic Acid Res., **6**, 3559 (1979).
94. Bailey J. M., Davidson N. Anal. Biochem., **70**, 75 (1976).
95. McMaster G. K., Carmichael G. C. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **74**, 4835 (1977).
96. McMaster G. K., Carmichael G. C. Methods Enzymol., **65**, 380 (1980).
97. Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., Boedtker H. Biochemistry, **16**, 4743 (1977).
98. Alwine J. C., Kemp D. J., Stark G. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **74**, 5350 (1977).
99. Williams J. G., Lloyd M. M., Devine J. M. Cell, **17**, 903 (1979).
100. Burckhardt J., Telford J., Birnstiel M. L. Nucleic Acids Res., **6**, 2963 (1979).
101. Bernardi G. Methods Enzymol., **21**, 95 (1971).
102. Bernardi G. Biochim. Biophys. Acta, **174**, 423, 435 (1969).
103. Martinson H. G. Biochemistry, **12**, 139, 145 (1973).
104. Martinson H. G. Biochemistry, **12**, 2731 (1973).
105. Britten R. J., Graham D. E., Neufeld B. R. Methods Enzymol., **29**, 363 (1974).
106. Jeppesen P. G. N. Methods Enzymol., **65**, 305 (1980).
107. Southern E. Methods Enzymol., **65**, 152 (1980).
108. Roberts R. J. Methods Enzymol., **65**, 1 (1980).
109. Chakrabarty A. M. (Editor), Genetic Engineering. — FL, Boca Raton: CRC Press, 1978.
110. Southern E. J. Mol. Biol., **98**, 503 (1975).
111. Reiser J., Renart J., Stark G. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 1104 (1978).
112. Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **76**, 3683 (1979).

113. Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T. *Cell*, **15**, 1157 (1978).
114. Stalder J., Larsen A., Engel J. D., Dolan M., Groudine M., Weintraub H. *Cell*, **20**, 451 (1980).
115. Fischer S. G., Lerman L. S. *Methods Enzymol.*, **68**, 183 (1979).
116. Favaloro J., Treisman R., Kamen R. *Methods Enzymol.*, **68**, 719 (1979).
117. McDonnell M. W., Siman M. N., Studier W. F. *J. Mol. Biol.*, **110**, 119 (1977).
118. Hardies S. C., Wells R. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 3117 (1976).
119. Larson J. E., Hardies S. C., Patient R. K., Wells R. D. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5535 (1979).
120. Eshaghpour H., Crothers D. M. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 13 (1978).
121. Sanger F. *Biochem. J.*, **124**, 833 (1971).
122. Weissman S. M. *Anal. Biochem.*, **98**, 243 (1979).
123. Wu R. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 607 (1978).
124. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisse M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A. *Science*, **147**, 1462 (1965).
125. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G. *J. Mol. Biol.*, **13**, 373 (1965).
126. Brownlee G. G., Sanger E. *Eur. J. Biochem.*, **11**, 395 (1969).
127. DeWachter R., Fiers W. *Anal. Biochem.*, **49**, 184 (1972).
128. Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4091 (1977).
129. Sanger F., Coulson A. R. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441 (1975).
130. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 5463 (1977).
131. Schreier P. H., Cortese R. *J. Mol. Biol.*, **129**, 169 (1979).
132. Maxam A. M., Gilbert W. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 560 (1977).
133. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2527 (1977).
134. Simonesits A., Brownlee G. G., Brown R. S., Rubin J. R., Guilley H. *Nature (London)*, **269**, 833 (1977).
135. Sanger F., Coulson A. R. *FEBS Lett.*, **87**, 107 (1978).
136. Axel R., Melchior W., Sollner-Webb B., Felsenfeld G. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 4101 (1974).
137. Noll M. *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1573 (1974).
138. Felsenfeld G. *Nature (London)*, **271**, 115 (1978).
139. Todd R. D., Garrard W. T. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4729 (1977).
140. Todd R. D., Garrard W. T. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3074 (1979).
141. Nelson P. P., Albright S. C., Wiseman J. M., Garrard W. T. *J. Biol. Chem.*, **254**, 11751 (1979).
142. Boulikas J., Wiseman J. M., Garrard W. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **77**, 127 (1980).
143. Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G., Mirabekov A. D. *J. Mol. Biol.*, **138**, 519 (1980).
144. Belyavsky A. V., Bavykin S. G., Gogvadze E. G., Mirabekov A. D. *J. Mol. Biol.*, **138**, 519 (1980).
145. Lilley D. M. J., Houghton M. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 507 (1979).
146. Waslylyk B., Chambon P. *Eur. J. Biochem.*, **103**, 219 (1979).
147. Bowen B., Steinberg J., Laemmli U. K., Weintraub H. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1 (1980).
148. Herrick G. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3721 (1980).
149. Patient R. K. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2647 (1979).

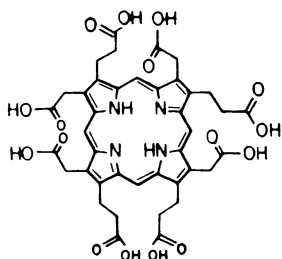
Глава 11

Порфирины и родственные им производные тетрапиррола

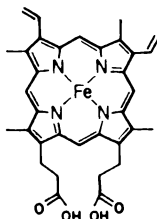
Дэвид Дольфин

11.1. Структура и химические свойства тетрапирролов

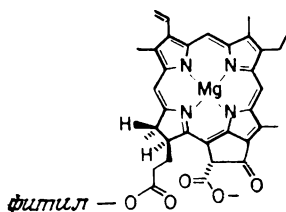
Порфирины, например уropпорфин III (19.1), гем [железо-порфин (19.2)] и родственные им пигменты фотосинтезирующих клеток — хлорофилл *a* (11.3) и бактериохлорофилл *a* (11.4), а также продукты катаболизма этих соединений — ациклические желчные пигменты [например, билирубин IX α



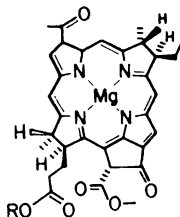
уропорфин III
11.1



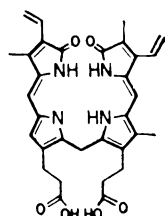
гем
11.2



хлорофилл a
11.3



бактериохлорофилл a
11.4



билирубин IX α
11.5

(11.5)] — выполняют разнообразные и важные биохимические функции. Нарушение нормального биосинтеза тетрапирролов

в организме человека приводит к различным патологическим расстройствам, называемым порфириями. Такого рода заболевания часто сопровождаются избыточным продуцированием, запасанием и выделением порфиринов. Поскольку тетрапирролы, обратившие на себя внимание в связи с той ролью, которую они играют в биохимических процессах, оказались к тому же и весьма интересными объектами исследования для различных отраслей физических наук, к настоящему времени накоплена довольно разнообразная и богатая информация об этих соединениях [1]. Сравнительно высокая молекулярная масса тетрапирролов, доминирующий эффект большого плоского ароматического кольца в циклической системе, а также низкая летучесть большинства этих соединений создают значительные трудности для их разделения и очистки с помощью таких классических методов, как перегонка, кристаллизация и возгонка. С другой стороны, все описанные здесь тетрапирролы обладают интенсивной окраской, многие из них флуоресцируют, поэтому их обнаружение, как визуальное, так и с помощью спектрофотометрии, представляет собой сравнительно простую задачу. Если принять во внимание все вышеизложенное, то покажется неудивительным, что в первых экспериментах по хроматографии, предпринятых Цветом [2], в качестве объекта были использованы пигменты листьев растений и что в настоящее время наилучшим методом выделения, разделения, очистки и анализа тетрапирролов является хроматография.

Разнообразные по своей природе периферические заместители в молекулах производных тетрапиррола определяют как стабильность этих соединений, так и выбор хроматографического метода, наиболее подходящего для их очистки. В случае же металлосодержащих производных необходимо учитывать еще и дополнительные факторы, поскольку образование комплекса сопряжено с изменением суммарного заряда молекулы, растворимости соединения и, следовательно, его стабильности и характера взаимодействия с сорбентом и подвижной фазой. Такое разнообразие химических и физических свойств не позволяет не только сделать какие-либо обобщения относительно предпочтительного метода хроматографирования порфиринов и родственных им тетрапирролов, но и предложить простую классификацию самих этих соединений. В силу вышеизложенного мы предпочли разбить все рассматриваемые соединения на две основные группы (гидрофобные и гидрофильные) и по отдельности, в соответствии со структурой хромофоров, обсудить различные методы их разделения. Тем не менее представляется возможным сделать некоторые замечания общего характера, касающиеся, в частности, стабильности и способов обнаружения производных тетрапиррола.

11.1.1. Стабильность

Многие из соединений группы тетрапиррола могут выполнять роль фотосенсибилизаторов в процессах перехода кислорода из основного триплетного состояния в синглетное. Поскольку двойные связи конъюгированных ароматических систем, а также ненасыщенные боковые заместители способны взаимодействовать с кислородом в синглетном состоянии, целесообразно — по меньшей мере в тех случаях, когда неизвестны химические свойства компонентов анализируемой смеси, — осуществлять хроматографическое разделение в отсутствие света (обычно достаточно обернуть колонку или хроматографическую камеру алюминиевой фольгой) и защищать вещество от воздействия света до и после хроматографирования. Кроме того, ароматический характер тетрапирролов способствует как одноэлектронному окислению циклической части молекулы, так и аутоокислению периферических заместителей, протекающему через промежуточное образование радикалов типа бензила. Когда молекулы адсорбированы на большой поверхности неподвижной фазы, скорость указанных реакций может существенно возрасти под действием света или окислителей, например присутствующих в растворителях пероксидов. Таким образом, как и в случае большинства других хроматографических экспериментов, для разделения рассматриваемых соединений следует использовать растворители подходящей квалификации. В силу того что тетрапирролы обладают высоким родством к ионам металлов, необходимо позаботиться о том, чтобы растворители и сорбент не содержали примесей ионов тяжелых металлов, способных образовывать комплексы с хроматографируемыми соединениями. На практике, когда проводят выделение достаточно больших количеств вещества, это свойство тетрапирролов, как правило, не создает особых проблем. Однако при работе на аналитическом уровне, особенно если соединения экстрагированы из природных источников, будь то биологические ткани или геологические образцы, необходимо отдавать себе отчет в том, что присутствие ионов металлов может привести к некоторому искажению хроматографической картины. Не существует никаких других удобных и общих способов избежать этого, кроме как свести к минимуму вероятность контактов образца с ионами металлов или металлами в ходе его экстракции, подготовки к анализу и хроматографирования (следует отметить, что даже никелированный шпатель может оказаться источником загрязнения образца). Поскольку константы связывания порфиринов с ионами металлов часто соизмеримы по своей величине с константами, характерными для таких хелатирующих агентов, как ЭДТА, использование последних при низкой концентрации с

целью удаления ионов металлов может оказаться неэффективным, а увеличение их концентрации приведет, скорее всего, к нежелательному изменению ряда свойств хроматографической системы.

С другой стороны, при работе с металлосодержащими производными тетрапиррола необходимо избегать условий, благоприятствующих деметаллированию этих комплексов. Большинство металлопорфиринов с трудом подвергается деметаллированию, однако это правило имеет и некоторые исключения. Например, магнийсодержащие порфирины теряют ион металла в присутствии даже следовых количеств соляной кислоты, которые содержатся в хлороформе, а также под воздействием сульфата магния, иногда используемого в качестве осушителя. Легкость деметаллирования магнийсодержащих хлорофиллов и бактериохлорофиллов с образованием соответствующих феофитинов создает одну из основных проблем, с которой приходится сталкиваться в ходе выделения и хроматографического разделения пигментов фотосинтезирующих клеток. К тому же, будучи ди- и тетрагидропорфиринами, эти соединения весьма склонны к окислению до порфиринов, изомеризации и ряду других превращений с образованием модифицированных хлорофиллов. В сущности, именно чрезвычайная чувствительность производных тетрапиррола к внешним воздействиям и заставила разработать описанные ниже очень мягкие методы выделения и хроматографирования этих соединений.

11.1.2. Обнаружение

Как отмечалось выше, все описываемые в данной главе тетрапирролы являются сильно окрашенными соединениями, интенсивно поглощающими свет во всем спектральном диапазоне ультрафиолетовой и видимой областей, что значительно облегчает как их качественный, так и количественный анализ. За разделением компонентов в ходе колоночной или тонкослойной хроматографии можно наблюдать визуально, причем таким способом можно обнаруживать менее одного микрограмма вещества. Еще более высокая чувствительность обнаружения характерна для флуоресцирующих соединений, т. е. для большинства не содержащих иона металла порфиринов, желчных пигментов и хлорофиллов. На тонкослойных пластинках флуоресцирующие зоны часто значительно легче увидеть, если слой сорбента смочен растворителем. Интенсивность флуоресценции пятен на бумажных хроматограммах можно увеличить путем опрыскивания последних изооктаном [3]. В обоих случаях для визуального обнаружения достаточно нанограммовых количеств веще-

ства. Интенсивность флуоресценции достигает наибольшей величины при возбуждении в максимуме полосы поглощения *Soret*, расположенной вблизи 400 нм, однако достаточно интенсивная флуоресценция наблюдается и при возбуждении светом с длиной волны 366 нм, т. е. при длине волны основной полосы спектра испускания многих имеющихся в продаже УФ-осветителей. В силу того что для большинства порфиринов характерны интенсивная флуоресценция и высокое значение молярного коэффициента поглощения, использование специальных опрыскивающих реагентов, широко практикуемое в тонкослойной хроматографии других органических соединений, в данном случае, как правило, не приводит к увеличению чувствительности обнаружения. Что же касается многих нефлуоресцирующих металлопорфиринов, то для повышения чувствительности их обнаружения целесообразно использовать пластинки, содержащие флуорофоры, или опрыскивать хроматограммы раствором флуорохрома, такого, как флуорантен [3].

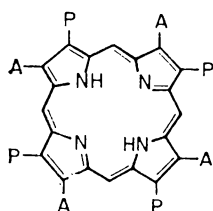
Подходящий реагент для обнаружения геминов предложен в работе [4]. Свежеприготовленный его раствор позволяет обнаружить нанogramмовые количества вещества. В оригинальной прописи предусмотрено использование бензидина, однако, поскольку это соединение является сильным канцерогеном, мы рекомендуем вместо него применять *o*-дианизидин [5]. Реагент готовят следующим образом. К 50 мл насыщенного раствора гидрохлорида *o*-дианизидина в метаноле добавляют 25 мл воды, затем 10 мл ледяной уксусной кислоты, 5 мл 3%-ного раствора пероксида водорода и 1 мл пиридина. При работе с этим реагентом следует проявлять особую осторожность, поскольку существует мнение, что все без исключения ароматические амины являются потенциально опасными канцерогенными веществами.

Интегральную интенсивность флуоресценции хроматографических пятен на тонкослойных пластинках можно оценить с помощью сканирующего флуориметра. Такой метод полуколичественного анализа используют, в частности, в клинической практике для обнаружения природных порфиринов [6]. Задача количественного определения тетрапирролов значительно упростилась в связи с появлением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, который можно легко приспособить для анализа любой из описанных ниже хроматографических систем. Так, с помощью детектора, работающего в режиме измерения поглощения при фиксированной длине волны или сканирования по всем длинам волн видимой области спектра, можно определить нанogramмовые количества порфиринов [7], а с помощью проточного флуориметра — до 30 пг [8].

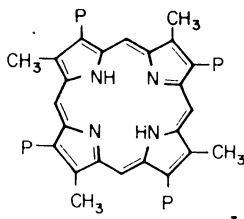
11.2. Водорастворимые соединения

11.2.1. Порфиринкарбоновые кислоты

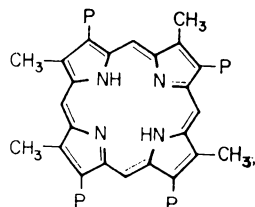
Значительное структурное сходство многих природных порфиринов, таких, как уропорфирины I (11.6) и III (11.1) или копропорфирины I (11.7) и III (11.8), и близость значений pK_a присутствующих в их молекулах карбоксильных групп обуславливают появление некоторых весьма специфических проблем, связанных с хроматографическим разделением этих соединений. Наилучшего отделения карбоксилсодержащих порфиринов от других водорастворимых метаболитов легче всего добиться путем этерификации этих соединений, в результате которой они приобретают липофильные свойства и могут быть выделены экстракцией органическими растворителями. Такой способ предварительного фракционирования порфиринов имеет немаловажное достоинство, заключающееся в том, что для сложных эфиров порфиринов уже разработано множество методов разделения и анализа (разд. 11.3.1.1). Мы рекомендуем хроматогра-



уропорфирин I
11.6



копропорфирин I
11.7



копропорфирин III
11.8

A = -CH₃CO₂H ; P = -CH₂CH₂CO₂H

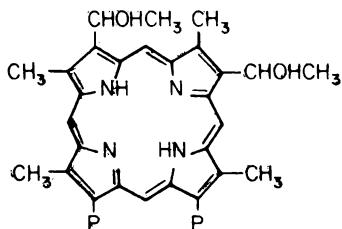
фировать карбоксилсодержащие порфирины в виде их метиловых эфиров, за исключением тех случаев, когда необходимо выделить немодифицированные соединения, предназначенные, например, для изучения реконструкции гемопротеидов. Следует также отметить, что разделению нативных карбоксилсодержащих порфиринов придают важное значение при разработке методов анализа непосредственно биологических образцов (в частности, с помощью ВЭЖХ) без предварительного выделения порфиринов или получения их производных.

11.2.1.1. Бумажная хроматография

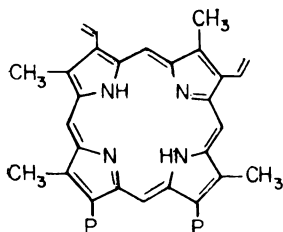
Поскольку бумажная хроматография требует значительно больше времени, чем ТСХ на целлюлозе или ВЭЖХ, этот метод разделения в настоящее время представляет главным образом

исторический интерес. Оригинальная методика Нишол и Римингтона [9], которые в качестве подвижной фазы использовали смесь насыщенных водой 2,4- и 2,5-лутидинов, была модифицирована Келом и Стичем [10], предложившими использовать для этой цели 2,6-лутидин, а затем Эриксоном [11] и Маузероллом [12], внесшими в нее некоторые дополнительные изменения.

Типичная процедура хроматографии сводится к следующему. Смесь порфиринов в виде раствора в 2 н. NH_4OH , содержащего 1—10 мкг вещества, наносят на бумагу (ватман № 1 или на другую бумагу, обладающую такими же свойствами) и после испарения растворителя хроматографируют в системе 2,6-лутидин — 0,7 М NH_4OH (10 : 7), пока фронт растворителя не достигнет высоты 20—30 см над стартовой линией (продолжительность элюирования может составлять 16 ч). Хроматографическая подвижность порфиринов в этой системе возрастает с уменьшением числа присутствующих в их молекулах карбоксильных групп. Поскольку абсолютные значения R_f зависят от множества переменных, для идентификации соединений целесообразно использовать стандарты, разработанные фирмой Porphyrin Products. (P.O. Box 31, Logan, UT, США.) Описанная система позволяет достаточно хорошо разделить порфиринкарбоновые кислоты в соответствии с их основностью, однако она обладает меньшей эффективностью по отношению к порфиринам, содержащим одинаковое число карбоксильных групп. Например, в этой системе можно разделить смесь копропорфиринов I (11.7) и III (11.8), тогда как уропорфирины I (11.6) и III (11.1), а также многие имеющие важное значение природные порфиринкарбоновые кислоты не разделяются в ней. Гематопорфирин (11.9), протопорфирин IX (11.10), мезопорфирин IX (11.11, $R_1=R_2=\text{Et}$) и дейтеропорфирин (11.11, $R_1=R_2=\text{H}$) можно отделить друг от друга с помощью предложенного Белчером и др. [13] метода бумажной хроматографии в системе пиридин — 0,2 М борат натрия, pH 8,6 (1 : 9). Чтобы увеличить скорость элюирования, Уиз [14] рекомендует использовать в качестве подвижной фазы 0,1 М хлорид лития и проводить хрома-



гематопорфирин
11.9



протопорфирин IX
11.10

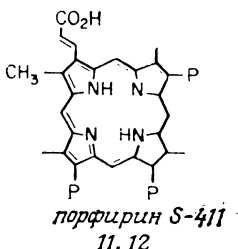
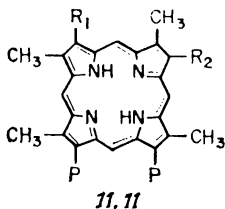
тографирование в атмосфере аммиака. В этой системе значения R_f возрастают с увеличением числа карбоксильных групп в молекуле порфирина.

11.2.1.2. Тонкослойная хроматография

Для тонкослойной хроматографии порфиринокислот были использованы пластинки с целлюлозой, тальком и силикагелем. Целлюлоза и тальк включены в число рассматриваемых в данном разделе сорбентов в основном из-за их исторического значения, а не практической ценности. Судя по нашему опыту, хроматография на силикагеле занимает меньше времени и позволяет достичь более высокого разрешения. Применение ТСХ в клинической практике для определения порфиринов в биологических жидкостях, тканях и фекалиях больных различными формами порфирии произвело переворот в диагностике этих заболеваний [15].

ТСХ на целлюлозе [16—19] подчиняется тем же закономерностям, что и описанная выше бумажная хроматография. Полное разделение смеси уропорфирина, копропорфирина и протопорфирина [17] было осуществлено в предложенной Енсенем [20] системе 2,6-лутидин — вода (10 : 3) в атмосфере аммиака [20]. Эта методика была в дальнейшем усовершенствована Юаном и Расселом [18], предложившими использовать систему 2,6-лутидин — аммиак — вода — 0,1 М ЭДТА (500 : 210 : 140 : 1), которая позволяет разделить копропорфирины I и III и отделить дейтеропорфирин от мезопорфирина. Однако, несмотря на то что разрешение хроматографических зон в тонком слое целлюлозы лучше, чем на бумаге, этот метод обладает тем же недостатком, что и бумажная хроматография: в оптимальных условиях (25 °С, в темноте) продолжительность элюирования составляет около 24 ч, т. е. разделение занимает значительно больше времени, чем в случае описанной ниже ТСХ на пластинках с силикагелем.

Уиз [21, 22] описал хроматографическое разделение порфиринокислот в тонких слоях талка, а Окуда и др. [23] и Белчер и др. [13] внесли некоторые усовершенствования



в эти системы. С помощью хроматографирования в системе этанол — 2,6-лутидин — вода (30 : 3 : 67) в атмосфере, насыщенной аммиаком, можно разделить порфирин S-411 (11.12) от копропорфина. На пластинках с тальком хроматографировали также гемато-, дейтеро-, мезо-, пемпто- и протопорфирины, однако качество разделения оказалось хуже, чем в описанных тем же автором условиях бумажной хроматографии [14].

Мандшенк [19] описал ТСХ порфиринкарбоновых кислот на силикагеле, однако мы отдаем предпочтение методу Эллфолка и Сиверса [24]. Предложенная этими авторами система хлороформ — метанол (17 : 3), к которой добавлена муравьиная кислота до 0,3 М концентрации, позволяет разделить порфиринкарбоновые кислоты в соответствии с их основностью (наибольшей подвижностью обладают порфирины, содержащие наименьшее число карбоксильных групп). В этой системе можно разделить смеси, содержащие протопорфирин, мезопорфирин, дейтеропорфирин, гематопорфирин и наполовину гидрированные формы протопорфина — 2-оксиэтил-4-винилпорфирин (11.11, R_1 = оксиэтил, R_2 = винил) и 2-винил-4-оксиэтилпорфирин (11.11, R_1 = винил, R_2 = оксиэтил).

11.2.1.3. Колоночная хроматография

Число сообщений о разделении порфиринкарбоновых кислот с помощью ВЭЖХ пока еще незначительно, однако неоспоримые преимущества этого метода позволяют надеяться, что в ближайшем будущем его ожидает существенно более широкое использование, особенно в тех случаях, когда с помощью других методов не удастся отделить порфирины от примесей или разделить их производные (рис. 11.1). Эванс и др. [25] показали, что смесь порфиринкарбоновых кислот, содержащих две, четыре и пять карбоксильных групп, можно разделить менее чем за 10 мин на ионообменной колонке с ионитом пеллионекс SA в режиме градиентного элюирования смесью метанола и уксусной кислоты. Позднее

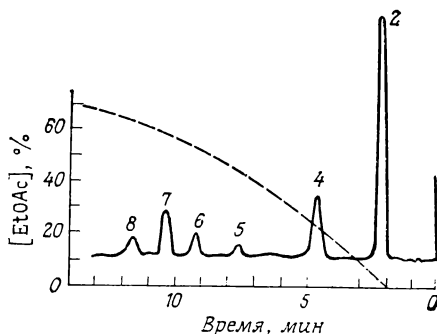


Рис. 11.1. ВЭЖХ метиловых эфиров порфиринов, содержащих от 2 до 8 карбоксильных групп [25].

Колонка: 60X3,175 см (внешний диаметр); сорбент: меркосорб SI 60 с размером частиц 10 мкм; градиентное элюирование от гексана к этилацетату; скорость потока 3 мл/мин; обнаружение по поглощению при 400 нм.

Бонне и др. [26] изучили разделение порфиринкарбоновых кислот на колонке с обращенной фазой (μ -бондапак C_{18} , Waters Assoc.*) в системах вода — метанол или вода — этанол в присутствии дигидрофосфата тетра-*n*-бутиламмония, выполняющего роль ион-парного реагента. Как видно из рис. 11.2, с помощью этого метода можно легко разделить смесь порфиринов, содержащих от четырех до шести карбоксильных групп, однако ни

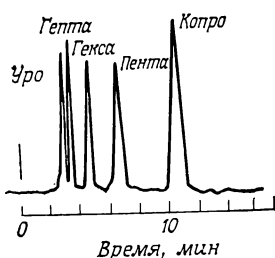


Рис. 11.2. ВЭЖХ порфиринов, содержащих от 4 до 8 карбоксильных групп [26] (с разрешения авторов). Колонка 30×0,4 см (внутр. диаметр); сорбент: μ -бондапак C_{18} ; элюент 80%-ный (по объему) водный метанол, содержащий 1 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония; скорость потока 1,0–1,5 мл/мин; обнаружение по поглощению при 400 нм.

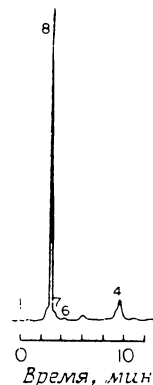


Рис. 11.3. ВЭЖХ образца мочи больного, страдающего врожденной порфирией [26] (с разрешения авторов). Колонка: 30×0,4 см (внутр. диаметр); сорбент: μ -бондапак C_{18} ; элюент: 80%-ный (по объему) водный метанол, содержащий 1 мМ дигидрофосфата тетрабутиламмония; скорость потока 1,0–1,5 мл/мин; обнаружение по поглощению при 400 нм.

изомерные копропорфирины I и III, ни аналогичные изомеры уропорфирина в этих условиях не разделяются. Возможность использования обращенно-фазовой ВЭЖХ для клинических целей проиллюстрирована на рис. 11.3, который отражает результаты анализа образца мочи больного, страдающего врожденной порфирией (образец не подвергали какой-либо предварительной обработке и вводили непосредственно в колонку). Полученная хроматограмма позволяет достаточно четко идентифицировать тетра-, гекса-, гепта- и октакарбоновые кислоты (соответствующие пики обозначены цифрами 4, 6, 7 и 8) и оценить их относительное содержание. Этот метод анализа можно будет признать совершенным, когда удастся осуществить удовлетворительное разрешение пиков, отвечающих свободным уропор-

* В настоящее время Waters Associates входит в состав фирмы Millipore — Прим. перев.

фиринам I и III. Недавно с помощью ВЭЖХ были разделены октаметиловые эфиры этих изомеров [27].

В работах [28—30] описана хроматография порфиринкарбоновых кислот на колонках с целлюлозой. Метод Эриксона [28] аналогичен описанному выше методу бумажной хроматографии (разд. 11.2.1.1) и заключается в следующем. Смесь порфиринов, которые подлежат разделению, адсорбируют на порошкообразной целлюлозе, сорбент высушивают и вносят в верхнюю часть колонки, заполненной сухой целлюлозой. При промывании колонки смесью 2,6-лутидин — вода (3 : 1) в первую очередь элюируются порфириндикарбоновые, а затем порфиринтетракарбоновые кислоты (скорость миграции последних примерно вдвое меньше). В этих условиях уропорфин остается сорбированным в верхней части колонки. С увеличением концентрации воды в элюенте (до соотношения 3 : 2) возрастает скорость миграции порфиринтетракарбоновых кислот, а последующее добавление небольших количеств концентрированного раствора аммиака приводит к полному высвобождению уропорфина. Несмотря на то что с помощью этого метода можно достаточно быстро и эффективно провести разделение анализируемой смеси, мы предпочитаем использовать описанный ниже метод колоночной хроматографии на силикагеле, поскольку он позволяет достичь лучшего разрешения порфиринкарбоновых кислот.

Колонку размером 150×2,5 см (внутр. диаметр) заполняют суспензией 100 г силикагеля (размер частиц 0,2—0,5 мм, квалификация «Пригодный для колоночной хроматографии») в смеси бензол — метанол — муравьиная кислота (110 : 30 : 1), оставляя в верхней части колонки слой растворителя высотой 5 см. Смесь порфиринов (600 мг) растворяют в минимальном объеме пиридина, добавляют 5 г силикагеля, растворитель удаляют в вакууме, остаток измельчают и суспендируют в небольшом объеме смеси растворителей, использованной при набивке колонки. Полученную суспензию осторожно наслаивают на уже имеющийся в колонке сорбент, затем колонку промывают элюентом вышеуказанного состава при скорости потока не менее 1 мл/мин (при необходимости с помощью сжатого азота создают небольшое избыточное давление). Скорость элюирования имеет немаловажное значение, поскольку слишком длительное пребывание порфиринов в колонке может привести к их этерификации.

Описана хроматография свободных порфиринкарбоновых кислот на колонках с тальком [31—33], целитом [34—38], оксидом алюминия, карбонатом кальция, оксидом магния и карбонатом магния [39]. Шварц и др. [40] с помощью хроматографии на сорбенте флорисил (трисиликат магния) разделили присутствующие в моче порфирины на три фракции, содержащие соответственно окта-, тетра- и дикарбоновые кислоты. Для разде-

ления порфиринкарбоновых кислот использованы также колонки с политрифторхлорэтиленом [41, 42], полиэтиленом [43] и полиамидом [44]. Вполне естественно было бы ожидать, что для этой цели найдет применение ионообменная или гель-хроматография, однако в действительности соответствующая литература представлена лишь несколькими публикациями. В работе [45] описано разделение порфиринов мочи на дауэксе 2, а в работе [46] сообщается об использовании гель-хроматографии на сефадексе G-25.

11.2.2. Металлопорфиринкарбоновые кислоты

В силу того что порфирины образуют с ионами металлов очень прочные комплексы, а связь аксиальных лигандов весьма лабильна, хроматографическое разделение эфиров металлопорфиринкарбоновых кислот представляет собой более сложную задачу, чем разделение соответствующих деметаллированных соединений. Во многих случаях целесообразно сначала очистить деметаллированный порфирин с помощью описанных выше методов, затем провести реконструкцию комплекса, которая, как правило, протекает количественно, а избыток ионов металла удалить с помощью ионного обмена или диализа [47].

Металлопорфиринкарбоновые кислоты часто получают с целью дальнейшего использования при изучении их рекомбинации с апогемопротейдами. Так, например, имеется богатый опыт по хроматографированию металлопорфириндикарбоновых кислот — комплексов протопорфирина, мезопорфирина, гематопорфирина и производных дейтеропорфирина — и в особенности их железосодержащих комплексов, которые называются геминами. Следует отметить, что разделение этих соединений с помощью большинства описываемых ниже методов сопровождается обменом аксиальных лигандов на лиганды, с которыми сталкивается молекула в ходе хроматографирования. Поэтому, чтобы получить металлопорфирины желаемого состава, выделенные соединения подвергают процедуре обратной замены аксиальных лигандов.

11.2.2.1. Бумажная хроматография

Описано разделение металлопорфиринов на промытой кислотой фильтровальной бумаге [48] и на бумаге, пропитанной раствором кремниевой кислоты [49]. По аналогии с вышеописанным методом бумажной хроматографии порфиринкарбоновых кислот (разд. 11.2.1.1) для разделения геминов в соответствии с числом присутствующих в их молекулах карбоксильных групп была использована система 2,6-лутидин — вода [50]. В этой же

работе описана обращенно-фазовая хроматография геминов на бумаге, пропитанной силиконовым маслом.

Раствор геминов в пиридине разбавляют раствором аммиака или свежеприготовленным раствором гидроксида натрия и наносят на обработанную силиконовым маслом бумагу, которую помещают во внутреннюю камеру двухсекционного хроматографа. Хроматограмму элюируют смесью вода — пропанол-1 — пиридин (55:1:4) до того момента, когда фронт растворителя продвинется примерно на 10 см от стартовой линии, что занимает около 1 ч. Внешнюю камеру хроматографа выстилают влажной бумагой, а на дно наливают пиридин из расчета 0,4 мл на 1 л объема камеры. С увеличением концентрации паров пиридина возрастают значения R_f и улучшается разрешение хроматографических зон, тогда как при слишком низкой концентрации паров пиридина протогемин вместо четких зон образует полосы. В этой обращенно-фазовой системе хроматографическая подвижность геминов возрастает с увеличением числа присутствующих в их молекулах карбоксильных групп. В случае геминов, для которых характерны высокие значения R_f , в качестве элюента лучше использовать систему вода — пропанол-1 — пиридин (60:1:1). На высушенных хроматограммах можно визуальным образом обнаружить до 50 нг вещества. Этот предел обнаружения можно уменьшить путем обработки хроматограмм о-дианизидином, как описано в разд. 11.1.2.

11.2.2.2. Тонкослойная хроматография

Известно несколько работ, посвященных ТСХ металлопорфиринов [20, 51, 52]. Самыми распространенными являются методики разделения геминов на силикагеле [53] и ТСХ разнообразных металлопорфиринов на полиамиде [54]. В работе [55] описано разделение геминов на силикагеле в системе бензол — метанол — муравьиная кислота (92:8:1) в режиме непрерывного испарения подвижной фазы, однако такая методика занимает много времени и не всегда позволяет получить удовлетворительные результаты. Хорошее разделение железосодержащих комплексов протопорфирина (11.10), гематопорфирина (11.9), дейтеропорфирина (11.11, $R_1=R_2=H$) и диацетилдейтеропорфирина (11.11, $R_1=R_2=CH_3CO-$) было достигнуто на пластинках с силикагелем в системе гексан — пропанол-1 — уксусная кислота (20:10:3) [53]. Наилучшие результаты получены в тех случаях, когда пластинки перед использованием выдерживали не менее 12 ч в комнатной атмосфере. Несмотря на то что подвижность геминов в этой системе характеризуется невысокими значениями R_f (значения R_f диацетилдейтерогемина, гематогемина, дейтерогемина, протогемина и мезогемина равны соответственно 0,08, 0,13, 0,20, 0,28 и 0,32), разрешение хроматографических

пятиен вполне удовлетворительное и не может быть улучшено за счет увеличения содержания пропанола в элюенте (добавление этого растворителя приводит только к увеличению подвижности протогемина и к образованию очень сильно вытянутой хроматографической зоны). В несколько модифицированной системе: бутанол-1 — вода — уксусная кислота (500 : 15 : 14) с хорошим разрешением разделяются комплексы мезопорфирина с трехзарядными ионами марганца, кобальта и железа [56].

Разделение металлопорфиринкарбоновых кислот с помощью ТСХ на полиамиде основано на взаимодействии их карбоксильных групп с амидными группами сорбента. Судя по нашему опыту, наилучшие и наиболее воспроизводимые результаты получаются при использовании тонкослойных пластинок фирмы Cheng Chin (Тайвань), которые можно приобрести у фирмы-посредника Gallard Schellinger (Cante Place, NY, США). Ламсон и др. [56] с помощью ТСХ на полиамиде в метаноле, содержащем 2,5% ледяной уксусной кислоты, разделили смесь протогемина (R_f 0,31), дейтерогемина (R_f 0,43), мезогемина (R_f 0,49) и гематогемина (R_f 0,81). Сривастава и Ёнетани [54] показали, что эти пластинки пригодны для очистки разнообразных металлопорфиринов, в том числе кобальт-, рутений-, родий-, цинк- и магнийсодержащих порфиринов. Авторами обнаружено, что наилучшие результаты можно получить при элюировании пластинок смесью пиридина с менее полярными растворителями. Естественно, состав элюента определяется свойствами разделяемых металлопорфиринов, поэтому невозможно подобрать какую-либо единственную систему растворителей, которая была бы пригодна для разделения всех этих соединений. Кобальтсодержащие протопорфирины хроматографируют в системе пиридин — пропанол-1 — гексан (1 : 1 : 2), а рутений- и родийсодержащие порфирины — в смесях пиридина и гексана.

11.2.2.3. Колоночная хроматография

Пока еще не появилось ни одного сообщения о разделении металлопорфиринкарбоновых кислот с помощью ВЭЖХ, однако, поскольку описано разделение этих соединений в тонком слое силикагеля (разд. 11.2.2.2), подобрать соответствующие системы растворителей для ВЭЖХ, по-видимому, не составит труда.

Описано разделение металлопорфиринкарбоновых кислот на колонках с оксидом алюминия, силикагелем, целлюлозой и с целлюлозой, обработанной силиконовым маслом [49, 56—62], но наиболее пригодным для этой цели является полиамид [54]. Системы растворителей, в которых можно проводить колоночную хроматографию на этом сорбенте, по своему составу аналогичны используемым в ТСХ. Так, например, гематогемин был очищен с помощью хроматографии на колонке с полиамидом

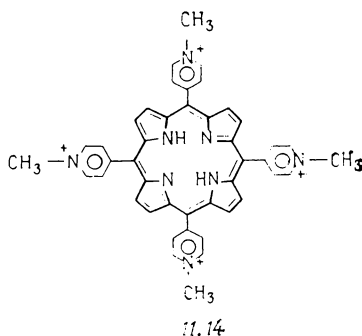
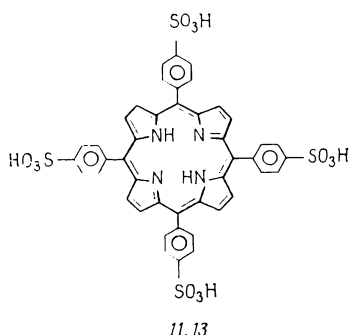
в системе бензол — уксусная кислота (9 : 1). В случае кобальт-содержащего протопорфирина колонку сначала промывали смесью пиридин — пропанол-1 — гексан (1 : 1 : 2), которая позволяет удалить минорные примеси, а целевой продукт элюировали смесью тех же растворителей, взятых в соотношении 2 : 1 : 2. Рутенийсодержащий мезопорфирин и его комплекс с моноксидом углерода были разделены в системе пиридин — гексан (3 : 2). В наших лабораториях этот метод был использован для очистки железопорфиринов (геминов) [44]. Низкая растворимость большинства металлопорфиринкарбоновых кислот далеко не всегда позволяет наносить их непосредственно на колонку и вынуждает предварительно сорбировать вещества на каком-либо подходящем носителе. Ниже в качестве примера описана предложенная нами методика колоночной хроматографии геминов.

Неочищенный гемин (600 мг) растворяют в минимальном объеме пиридина, раствор наносят в виде узкой полоски на слой силикагеля толщиной 2 мм, затем пластинку высушивают в потоке теплого воздуха, силикагель, содержащий сорбированные вещества, соскребают с пластинки и тщательно измельчают. Колонку 125×2,5 см (внутр. диаметр) заполняют суспензией 100 г порошкообразного полиамида (с размером частиц 70 мкм производства фирмы Macherey-Nagel (Brinkmann, Westbury, NY, США) в смеси бензол — метанол — муравьиная кислота (110 : 30 : 1), по окончании набивки на сорбент осторожно наслаивают суспензию содержащего гемин силикагеля в той же системе растворителей. Колонку элюируют этой же смесью растворителей при скорости потока 6—9 мл/мин (избыточное давление создают сжатым азотом). Сравнительно высокая скорость элюирования (в 6—9 раз больше скорости элюирования под действием силы тяжести) необходима для того, чтобы свести к минимуму возможность этерификации карбоксильных групп гемина. В этих условиях картина разделения аналогична получаемой при хроматографировании в тонком слое полиамида (разд. 11.2.2.2). Фракцию, содержащую гемин, концентрируют в вакууме. В ходе хроматографирования может произойти замена исходных аксиальных лигандов гемина на различные лиганды, присутствующие в системе растворителей. Путем перекристаллизации комплексов из смеси пиридина, хлороформа, уксусной и соляной кислот получают хлорид гемина [63].

11.2.3. Водорастворимые порфирины, лишенные карбоксильных групп

мезо-Тетра(4-сульфonatoфенил)порфирин (11.13) и *мезо*-тетра(N-метилпиридил)порфирин (11.14) являются основными водорастворимыми синтетическими порфиринами. Оба эти ве-

щества растворимы в кислотах и щелочах. Хотя и нет никаких сообщений о разделении водорастворимых синтетических порфиринов на бумаге, тем не менее для этой цели, по-видимому, можно использовать описанный выше метод бумажной хроматографии водорастворимых порфиринкарбоновых кислот.



Разделение смеси мезо-тетра(4-сульфonatoфенил)порфирина и его предшественников, содержащих одну, две и три сульфогруппы, было осуществлено с помощью ТСХ на пластинках с силикагелем в системе пиридин — хлороформ — вода (2 : 1 : 1) [64].

В работе [65] описано разделение сульфопроизводных тетрафенилпорфиринов на колонке, содержащей промытую кислотой диатомовую землю, в системе пиридин — хлороформ — вода (2 : 1 : 1), однако Пастернак и др. [66] обнаружили, что этот метод дает неудовлетворительные результаты, и рекомендовали вместо него использовать хроматографию на дауэксе 50W-X8. Число публикаций, касающихся хроматографии синтетических водорастворимых порфиринов, чрезвычайно мало, однако очевидно, что для разделения этих соединений, скорее всего, пригодны описанные выше методы хроматографии водорастворимых порфиринкарбоновых кислот.

11.3. Водонерастворимые соединения

11.3.1. Порфирины

11.3.1.1. Эфиры порфиринкарбоновых кислот

Превращение водорастворимых порфиринкарбоновых кислот в эфиры, которые не растворяются в воде, но растворимы в органических растворителях, облегчает их отделение от других водорастворимых соединений. Известно несколько удобных методов этерификации этих соединений, в том числе методов по-

лучения их метиловых эфиров под действием метанола в присутствии серной кислоты или трифторида бора [15]. Для этерификации порфиринкарбоновых кислот можно также использовать диазометан. Следует, однако, отметить, что этот реагент, по-видимому, непригоден для этерификации металлопорфиринов: по крайней мере в случае железопорфиринов в результате реакции образуются окрашенные в зеленый цвет трудноотделимые побочные продукты.

11.3.1.1.1. Бумажная хроматография

В работе [67] описано разделение метиловых эфиров уропорфина I (11.6), копропорфина I (11.7) и III (11.8), протопорфина IX (11.10) и мезопорфина (11.11, $R_1=R_2=Et$). Смесь хроматографировали в системе керосин — хлороформ (20 : 13) в атмосфере хлороформа, хроматограмму высушивали и вновь элюировали в том же направлении смесью керосин — пропанол-1 (5 : 1) в атмосфере паров керосина. Предложенное в работе [68] некоторое усовершенствование этой методики заключается в том, что второе элюирование проводят в направлении, перпендикулярном первому. Впоследствии Баретт [58, 69] модифицировал этот хроматографический метод, приспособив его для разделения гидроксилсодержащих порфиринов.

Вышеупомянутые методы пригодны для разделения порфиринов, различающихся числом сложноэфирных групп; в случае же эфиров порфириндикарбоновых кислот они дают неудовлетворительные результаты. Поэтому, чтобы разделить такие соединения, Чу и Чу [70] и разработали специальный, более сложный метод двумерной хроматографии, описание которого приведено ниже.

Внешнюю камеру двухсекционного хроматографа выстилают бумагой, пропитанной керосином, а на дно наливают тетрагидропиран из расчета 0,2 мл на 1 л объема камеры. Хроматограмму элюируют смесью керосин — тетрагидропиран — метилбензоат (100 : 28 : 7). После того как фронт растворителя продвигается на расстояние 15 см от старта, хроматограмму вынимают, высушивают в течение 10 мин при 105—110 °С, затем обрабатывают петролевым эфиром (т. кип. 65—110 °С), окунают в 12,5%-ный (масса/объем) раствор силиконового масла (Dow-Corning 550) в петролевом эфире и вновь высушивают при 105—110 °С. Обработанную таким способом хроматограмму элюируют во втором направлении, перпендикулярном первому, смесью вода — ацетонитрил — пропанол-1 — пиридин (38 : 10 : 20 : 5) в атмосфере, насыщенной парами воды (бумагу выстилающую внешнюю камеру хроматографа, пропитывают водой). Этот метод, представляющий собой сочетание обычной и обра-

шенно-фазовой распределительной хроматографии, позволяет разделить метиловые эфиры протопорфирина IX, гематопорфирина, дейтеропорфирина и мезопорфирина.

Фалк и сотр. [71, 72] сообщили, что с помощью бумажной хроматографии в диоксане можно разделить метиловые эфиры уропорфирина I (11.6) и III (11.1). Однако этот вывод, основанный на том, что на хроматограмме обнаруживаются две четкие зоны, был опровергнут Богорадом и Марксом [73], которые с помощью радиоактивно меченных порфиринов показали, что в действительности каждая из этих зон содержит оба изомера уропорфирина. В результате дальнейших исследований, принятых в работах [74, 75], удалось найти такие условия бумажной хроматографии, которые позволяют оценивать относительное содержание уропорфиринов I и III в смеси, однако в силу чрезвычайной трудоемкости этот метод количественного анализа не нашел широкого применения и к настоящему времени вытеснен предложенным Боммером и др. [27] методом ВЭЖХ (разд. 11.3.1.1.3).

11.3.1.1.2. Тонкослойная хроматография

Высокая скорость анализа в сочетании с хорошим разрешением хроматографических зон, а также гибкость метода ТСХ обеспечили ему широкое применение, чем и обусловлена многочисленность сообщений о разделении эфиров порфиринкарбоновых кислот с помощью этого метода (см. недавно опубликованные обзоры [62, 76]). Применению ТСХ в клинической практике для идентификации порфиринов и их количественного анализа с целью диагностики различных форм порфирии посвящены обзоры [15, 77]. Для ТСХ эфиров порфиринкарбоновых кислот были использованы разнообразные сорбенты, в том числе целлюлоза, тальк, полиамид, оксид алюминия и силикагель [16, 17, 23, 75, 78—103], однако наш опыт работы свидетельствует о том, что в большинстве случаев вполне удовлетворительное разделение можно получить на силикагеле — необходимо лишь подобрать соответствующую систему растворителей. Дос [77] рекомендует для аналитических целей использовать систему бензол — этилацетат — метанол (170 : 27 : 3), а для препаративных — ту же систему, но с несколько более высоким содержанием метанола. Естественно, чтобы результаты были воспроизводимы, необходимо использовать сорбент одной и той же активности. Исходные зоны нанесенного на пластинку образца можно сконцентрировать в очень узкие полосы путем кратковременного элюирования пластинки смесью хлороформ — метанол (5 : 1) (достаточно, чтобы фронт растворителя продвинулся на расстояние 5 мм от стартовой линии). Этот же эффект мож-

но получить на коммерческих пластинках (например, на пластинках типа Linear-K фирмы Whatman), содержащих слой «предсорбента», т. е. нанесенного в виде узкой полосы менее активного сорбента. В качестве элюентов для ТСХ используют смеси хлороформа с углеводородами, например смесь хлороформ — петролейный эфир (т. кип. 30—60 °C) (5 : 1); хроматографирование проводят в атмосфере аммиака (в хроматографическую камеру помещают сосуд с 10%-ным водным раствором аммиака) [92].

Для разделения метиловых эфиров порфириндикарбоновых кислот — протопорфирина (11.10), гематопорфирина (11.9) и дейтеропорфирина (11.11, $R_1=R_2=H$) — используют пластинки, приготовленные из суспензии силикагеля, содержащей 3% (масс/объем) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, или готовые пластинки, обработанные раствором сульфата железа(II), а затем элюированные смесью бензол — метанол (20 : 1) [101]. Диметиловые эфиры протопорфирина (11.10) и мезопорфирина (11.11, $R_1=R_2=Et$) были разделены на силикагеле в системе керосин — пентандион-2,4 — метилбензоат (12 : 7 : 1), а диметиловые эфиры протопорфирина (11.10) и дейтеропорфирина (11.11, $R_1=R_2=H$) удалось отделить друг от друга с помощью обращенно-фазовой распределительной хроматографии на сорбенте, покрытом слоем силиконового масла, в системе диоксан — ацетонитрил — вода (1 : 7 : 2) [102]. Кроме того, для разделения эфиров порфириндикарбоновых кислот в соответствии с числом присутствующих в их молекулах сложноэфирных групп пригодны следующие системы растворителей: керосин — хлороформ — пропанол (60 : 35 : 2) [104], бензол — этилацетат — метанол (85 : 13 : 3) [100] и четыреххлористый углерод — дихлорметан — этилацетат — этилпропионат (2 : 2 : 1 : 1) [81]. Очевидно, что для этой цели может быть использовано и множество других аналогичных по своему составу или элюирующей способности систем растворителей.

В более сложных случаях, например при разделении эфиров порфириндикарбоновых кислот или изомерных копропорфиринов и родственных им соединений, необходимо подбирать специальные условия. В настоящее время не известно ни одного метода полного разделения тетраметиловых эфиров урпорфиринов I, II, III и IV. С помощью предложенного Кардиналом и др. [92] метода хроматографирования в системе хлороформ — петролейный эфир (5 : 1) в атмосфере аммиака можно отделить копропорфирин I (R_f 0,69) от копропорфирина IV (R_f 0,66), однако изомеры II и III при этом не разделяются (R_f 0,55); с помощью же системы Доса [100], представляющей собой смесь бензоата, этилацетата и метанола (85 : 13 : 3), разделяются копропорфирины II, III и IV (R_f 0,67, 0,69 и 0,72), а изомеры I и II обладают одинаковой хроматографической подвижностью

(R_f 0,67). Ни один из известных методов ТСХ не позволяет разделить октаметилловые эфиры уропорфиринов I и III, однако это осуществимо с помощью ВЭЖХ [27]. Если же исследователь не располагает ВЭЖХ-системой, то анализ смеси уропорфиринов можно провести путем частичного декарбоксилирования этих соединений [105] с последующим разделением образовавшихся копропорфиринов либо в виде свободных кислот (разд. 11.2.1.1), либо в виде их тетраметилловых эфиров (см. выше).

11.3.1.1.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Поскольку с помощью ВЭЖХ можно довольно легко разделить эфиры порфиринкарбоновых кислот и оценить их количество, этот метод хроматографии особенно полезен при анализе биологически важных порфиринов. Большинство публикаций на эту тему посвящено описанию методик анализа порфиринов, извлекаемых из биологических жидкостей и тканей организмов. В некоторых случаях с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ удается разделить природные порфиринкарбоновые кислоты (разд. 11.2.1.3), однако, как правило, со значительно более низким разрешением, чем соответствующие эфиры. Известно множество методик этерификации порфиринкарбоновых кислот, причем некоторые из них включают стадию предварительной очистки образцов, которая необходима для удаления примесей, мешающих последующему анализу [25, 106—108].

С помощью хроматографии на сорбенте порасил Т (Waters Assoc.) в режиме изократического элюирования смесью петролейный эфир — дихлорметан (5 : 4) Карлсону и Дольфину [7] удалось полностью разделить смесь метилловых эфиров порфиринкарбоновых кислот, содержащих от двух до восьми карбоксильных групп, причем, как видно из рис. 11.4, было достигнуто очень хорошее разрешение (провалы между хроматографическими пиками достигают базовой линии). Чтобы воспрепятствовать уширению пиков и исключить возможность образования «хвостов», колонку перед введением образца промывают смесью пропанол-1 — триэтиламин — дихлорметан (5 : 2 : 193). Аналогичные результаты получены при разделении таких соединений на колонке с силикагелем в режиме градиентного элюирования от гексана к этилацетату или изократического элюирования смесью этилацетат — петролейный эфир (т. кип. 60—80 °C) с программированием скорости потока [25]. Столь же высокое разрешение было достигнуто и при использовании других элюентов, в том числе систем этилацетат — циклогексан [108, 109], бензол — этилацетат — хлороформ (7 : 1 : 2) и *n*-гептан — метилацетат (3 : 2) [110]. На колонке с обращенной фазой (μ -порасил C₁₈) при изократическом элюировании в системе ацетонитрил — вода (7 : 3) можно легко отделить этиловые эфиры

копропорфиринов I и II от их изомеров III и IV [111]. В этой же работе удалось решить и значительно более трудную задачу — разделить копропорфирины III и IV. Метилловые эфиры этих соединений хроматографировали на сорбенте μ -порасил в системе эфир — *n*-гептан (2 : 3), содержащей воду в количестве 90% от насыщения, причем для полного разделения изомеров потребовалось 10 циклов.

Недавно была решена одна из наиболее сложных хроматографических проблем, связанных с анализом природных порфиринов — разделены уропорфирины I и III. Эти соединения (11.6 и 11.1) различаются лишь взаимным расположением остатков уксусной и пропионовой кислот в кольце D. В 1979 г. Боммер и др. [27] показали, что уропорфирины I и III можно разделить в виде их метилловых эфиров с помощью циркуляционной хроматографии на сорбенте μ -порасил (Waters Assoc.) в системе *n*-гептан — уксусная кислота — вода (1800 : 1200 : 600 : 1). После пя-

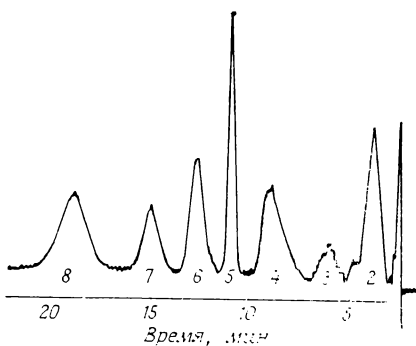


Рис. 11.4. Эталонная хроматограмма смеси метилловых эфиров порфиринов, содержащих от 2 до 8 карбоксильных групп [7] (с разрешения авторов).

Колонка: 60×3.175 см (внешний диаметр); сорбент: порасил T (Waters), предварительно промытый смесью пропанол-1 — триэтиламин — дихлорметан (5 : 2 : 193); элюент: дихлорметан — петролейный эфир (5 : 2); изократический режим с программированием скорости потока; обнаружение по поглощению при 403 нм.

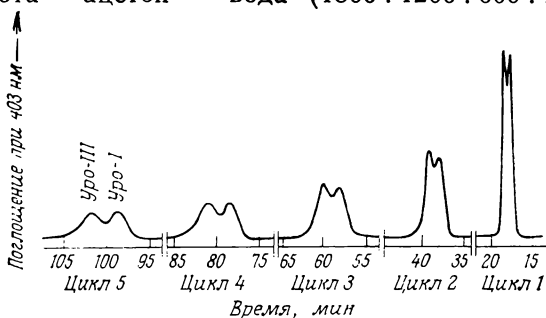


Рис. 11.5. Циркуляционная ВЭЖХ смеси примерно равных количеств (по 1 мкг) метилловых эфиров уропорфиринов I и III на двух последовательно соединенных колонках [27] (с разрешения авторов).

Колонки: 300×4 мм (внутр. диаметр); сорбент: μ -порасил (Waters); элюент: *n*-гептан — ледяная уксусная кислота — ацетон — вода (1800 : 1200 : 600 : 1); скорость потока 1,5 мл/мин; обнаружение при 403 нм. Пики, отвечающие метилловым эфирам уропорфиринов I и III, обозначены уро-I и уро-III.

ти циклов разрешение этих изомеров составляло более 92% (рис. 11.5). Эта же система растворителей была использована для разделения смеси метиловых эфиров порфиринов, содержащих от двух до восьми карбоксильных групп (рис. 11.6).

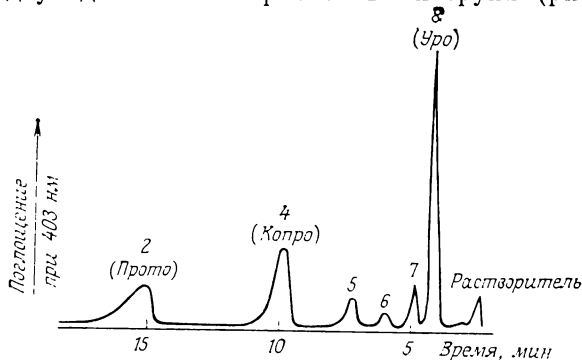


Рис. 11.6. Разделение метиловых эфиров порфиринов, содержащих от 2 до 8 карбоксильных групп [27] (с разрешения авторов).

Две последовательно соединенные колонки: 300×4 мм (внутр. диаметр); сорбент: μ -порасил (Waters); элюент n -гексан — ледяная уксусная кислота — ацетон — вода (1800 : 1200 : 600 : 1); скорость потока 1,5 мл/мин; обнаружение по поглощению при 403 нм.

11.3.1.1.4. Обычная колоночная хроматография

В силу того что эфиры порфиринкарбоновых кислот достаточно стабильны и обладают сравнительно высокой растворимостью, для их очистки вполне пригоден метод колоночной хроматографии. Эти соединения хроматографировали на колонках с карбонатом кальция, карбонатом магния, оксидом магния, оксидом алюминия, целитом (диатомовой землей), силикагелем и сефадексом.

Карбонат кальция был одним из первых сорбентов, использованных для разделения эфиров порфиринкарбоновых кислот [112, 113] (например, эфиров протопорфирина и дейтеропорфирина [39]), однако при этом часто приходилось сталкиваться с невоспроизводимостью результатов. Уайт и др. [76] обнаружили, что изменение активности карбоната кальция не позволяет решить эту проблему, поскольку в данном случае определяющим фактором является кристаллическая структура сорбента. Согласно данным этих авторов, оптимальной разрешающей способностью обладает смесь, содержащая 60% арагонита и 40% кальцита (две кристаллические модификации карбоната кальция). Ими же высказано предположение, что удовлетворительные результаты могут быть получены при использовании смесей кальцита и карбоната бария, который имеет структуру арагонита. Фахрп и Смит [114] предложили использовать карбонат

кальция, активированный путем нагревания при 100 °С в течение 12 ч. Карбонат кальция следует набивать в колонку в сухом виде, а затем смачивать элюентом, либо подавая последний в верхнюю часть колонки под небольшим давлением, либо создавая небольшое разрежение на выходе из колонки. Подходящими системами растворителей являются смеси бензол — хлороформ (10 : 1) и петролейный эфир — дихлорметан (1 : 1). Чтобы увеличить скорость элюирования компонентов, обладающих низкой хроматографической подвижностью, до приемлемой величины, можно использовать пологий градиент концентрации полярного растворителя.

Как с оксида, так и с карбоната магния в первую очередь элюируются порфирины, содержащие наибольшее число сложноэфирных групп, т. е. в данном случае порядок элюирования отличается от характерного для других рассматриваемых здесь сорбентов. Разделение диметиловых эфиров протопорфирина, мезопорфирина и дейтеропорфирина на колонке с оксидом магния описано в работе [5].

Чу и Чу [34—36] подробно изучили условия разделения эфиров порфиринкарбоновых кислот на диатомовой земле (целите) и обнаружили, что хроматографическая подвижность этих соединений возрастает с уменьшением числа сложноэфирных групп в их молекулах. Колонку набивают сухим целитом, образец растворяют в подходящем растворителе (например, в дихлорметане), адсорбируют на небольшом количестве целита, затем растворитель удаляют в вакууме, полученный материал вносят в верхнюю часть колонки и элюируют смесью хлороформ — петролейный эфир (1 : 2). Хроматографирование на этом сорбенте происходит довольно медленно, поэтому часто необходимо создавать небольшое разрежение на выходе из колонки, чтобы увеличить скорость потока. Рекомендуется не элюировать порфирины из колонки, а по окончании их разделения отсосать растворитель, выбить «колбаску» сорбента из колонки и разрезать ее на соответствующие зоны. Порфирины извлекают путем экстракции 5%-ным раствором метанола в дихлорметане. Если в системе хлороформ — петролейный эфир хроматографическая подвижность компонентов анализируемой смеси мала, то для их разделения используют градиент концентрации метанола в дихлорметане.

Бэчманн и Бёрнхам [115] сообщили о разделении эфиров уропорфирина, копропорфирина, мезопорфирина и дейтеропорфирина на двух последовательно соединенных колонках размером 90×2,5 см с сефадексом LH-20 в системе хлороформ — метанол (1 : 1).

Разделение эфиров порфиринкарбоновых кислот на оксиде алюминия впервые описано Николасом [39]. С тех пор этот

метод колоночной хроматографии на оксиде алюминия марки V в бензоле с успехом использовали для очистки эфиров самых разнообразных порфиринкарбоновых кислот, в том числе протопорфирина [116]. Аналогичный способ очистки диметилового эфира протопорфирина предложен в работе [117]: 20 г неочищенного образца наносили на колонку, содержащую 450 г оксида алюминия, и быстро элюировали хлороформом. В этих условиях структурные повреждения винильных групп протопорфирина минимальны. Очень широкие возможности хроматографии на оксиде алюминия продемонстрированы в работе [63], в которой описана очистка диметилowych эфиров некоторых производных дейтеропорфирина (11.11), содержащих разнообразные заместители R_1 и R_2 : $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{Br}$, $-\text{NO}_2$ и $-\text{CN}$. В каждом случае хроматография на оксиде алюминия (около 35 г сорбента на 1 г порфирина) в хлороформе, который, вероятно, содержал в качестве стабилизатора этанол, позволяла получить достаточно чистый препарат. Эти же авторы с помощью хроматографии на оксиде алюминия в системе хлороформ — 1,2-дихлорэтан (1 : 2) очистили 2-формил-4-винилпорфирин (11.11, R_1 =формил, R_2 =винил) и 2-винил-4-формилпорфирин (11.11, R_1 =винил, R_2 =формил). Позднее [118] на том же сорбенте удалось разделить эти изомеры. Аналогичная методика разделения диметилowych эфиров протопорфирина, 2-формил-4-винилдейтеропорфирина, 2,4-диформилдейтеропорфирина, а также 2- и 4-моноформилдейтеропорфиринов описана в работе [119] (в качестве элюентов использованы хлороформ и эфир).

Для препаративного выделения порфиринов, связанного с очисткой основного компонента от небольших количеств примесей, оксид алюминия можно брать из расчета 50 г на 1 г образца, а часто бывает достаточно и половины указанного количества сорбента. Однако в более сложных случаях следует использовать значительно большее количество оксида алюминия — вплоть до 500 г на 1 г образца. Благодаря высокой растворимости эфиров порфиринкарбоновых кислот их можно наносить на колонку в небольшом объеме бензола или хлороформа. Подходящий элюент можно подобрать путем анализа данных о хроматографической подвижности компонентов смеси, подлежащей разделению или очистке, в условиях ТСХ на пластинках с оксидом алюминия. Для этой цели обычно пригодны смеси бензола, хлороформа или дихлорметана с метанолом. Все эфиры порфиринкарбоновых кислот можно элюировать путем постепенного увеличения полярности смеси растворителей, создавая градиент концентрации сначала хлороформа, а затем метанола. Хроматографирование может сопровождаться расщеплением сложнэфирных связей с образованием некоторого количества свободных порфиринкарбоновых кислот, которые довольно проч-

но удерживаются на колонке, однако по окончании разделения их можно смыть при более высоких концентрациях метанола. Если в состав элюента входит какой-либо спирт, то не исключена возможность переэтерификации эфиров порфиринкарбоновых кислот в ходе их разделения. Этого можно избежать путем добавления в систему растворителей того же самого спирта, остаток которого присутствует в сложноэфирных группах хроматографируемых соединений.

Силикагель получил столь же широкое применение в хроматографии эфиров порфиринкарбоновых кислот, как и оксид алюминия, однако он обладает меньшей емкостью. Лукас и Ортен [120] хроматографировали метиловые эфиры уропорфирина I, копропорфирина I, мезопорфирина и протопорфирина на силикагеле в системах петролейный эфир — хлороформ. Для того чтобы добиться полного разделения смеси указанных соединений, нужно постепенно увеличивать концентрацию хлороформа в элюенте. Первым выходил из колонки эфир протопорфирина, а затем элюировались остальные компоненты смеси в порядке увеличения числа сложноэфирных групп в их молекулах. Уайт и др. [76] проводили хроматографирование на колонках с сухим сорбентом, а в качестве элюента использовали предложенную Кардиналом и др. [92] систему растворителей [петролейный эфир (т. кип. 30—60 °C) — хлороформ (1 : 5)], исключив из нее аммиак. В действительности любые системы растворителей, пригодные для ТСХ на силикагеле, можно также использовать и для проведения колоночной хроматографии на этом сорбенте.

11.3.1.2. Октаалкил- и мезо-тетраарилпорфирины

Октаалкилпорфирины широко распространены в природе. Они входят в состав нефти и других геологических образцов, где часто присутствуют в виде комплексов с ионами никеля или ванадила. К тому же октаалкилпорфирины, особенно октаэтилпорфирин, как и мезо-тетраарилпорфирины (например, мезо-тетрафенилпорфирин), широко используются в качестве симметричных аналогов природных порфириновых систем. Соединения обоих классов близки по своим хроматографическим свойствам, так что в общем случае системы растворителей, разработанные для разделения соединений одного класса, после незначительного изменения их состава применимы и для разделения соединений другого класса. Более того, эти системы растворителей лишь немного менее полярны по сравнению с используемыми при хроматографировании эфиров порфириндикарбоновых кислот, так что методики, пригодные для разделения последних, могут быть использованы и в случае октаалкил- и мезо-тетраарилпорфиринов.

При температуре ниже 250 °С порфирины обладают низкой летучестью, поэтому классическая газовая хроматография непригодна для анализа этих соединений. Чтобы разделить разнообразные октаалкилпорфирины и эфиры порфиринкарбоновых кислот, Караяннис и Корвин [121] в качестве газов-носителей использовали фторированные углеводороды при температурах выше критических (около 170 °С) и давлении вплоть до 96 МПа. Появление ВЭЖХ, а также значительные экспериментальные трудности, с которыми сопряжено применение сверхкритической газовой хроматографии, низвели ее до уровня метода, представляющего лишь исторический интерес — по крайней мере для химиков, работающих в области исследования порфиринов.

Весьма ограниченное применение находит и бумажная хроматография. Описан [122] один пример ее использования для разделения порфиринов из геологических образцов, однако этот метод не обладает какими-либо достоинствами, которые позволили бы рекомендовать его для анализа или разделения алкил- и арилзамещенных порфиринов.

Судя по нашему опыту, для тонкослойной хроматографии рассматриваемых соединений пригодны те же сорбенты, которые используются при разделении эфиров порфиринкарбоновых кислот (разд. 11.3.1.1.2), и несколько менее полярные системы растворителей. Следует, однако, отметить, что почти все октаалкил- и мезо-тетраарилпорфирины обладают низкой растворимостью, поэтому даже при нанесении сравнительно небольших количеств анализируемого образца пластинка может оказаться перегруженной. Для аналитической и препаративной ТСХ на пластинках с оксидом алюминия или силикагелем в качестве элюента можно использовать бинарные системы, например дихлорметан, хлороформ или бензол в сочетании с петролейным эфиром, этилацетатом, метанолом или тетрагидрофураном.

Известно немного примеров, когда характерное для ВЭЖХ высокое разрешение необходимо при изучении алкил- и арилзамещенных порфиринов, однако несомненно, что для разделения этих соединений можно приспособить методики, разработанные для эфиров демеаллированных порфиринкарбоновых кислот (разд. 11.3.1.1.3). Действительно, с помощью ВЭЖХ на сорбенте корасил II (Waters) в системе этилацетат — петролейный эфир Эвансу и др. [25] удалось отделить октаметилпорфирин от октаэтилпорфирина. Естественно ожидать, что метод ВЭЖХ найдет широкое применение в области исследования порфиринов нефти, поскольку в данном случае приходится иметь дело с очень сложной смесью родственных соединений. Определенные успехи в этом направлении уже достигнуты. Так, на-

пример, Хаджибрахин и др. [123], используя различные типы силикагеля и режимы градиентного элюирования от гексана к толуолу, добились частичного разрешения деметаллированных порфиринов сырой нефти. Аналогичные результаты были получены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с сорбентом μ -бондапак C_{18} (Waters) при изократическом элюировании в системе ацетонитрил — вода (7 : 3).

Системы растворителей, разработанные для ТСХ, могут быть без каких-либо изменений использованы и для колоночной хроматографии, в частности для хроматографии на колонках с оксидом алюминия и силикагелем. При нанесении образцов на колонку необходимо соблюдать некоторые меры предосторожности: в силу низкой растворимости порфиринов часто бывает необходимо наносить их из довольно большого объема. В общем случае наиболее подходящими растворителями для этой цели являются хлороформ и дихлорметан. Если образец не концентрируется в самом начале колонки в виде узкой зоны, то для набивки колонки и растворения образца следует использовать бензол или толуол. Если же и эта мера окажется недостаточной, то, возможно, проблему удастся решить с помощью хроматографии на колонках с сухим сорбентом [43]. Этот метод, впервые введенный в практику исследования порфиринов Адлером и др. [124], нашел особенно широкое применение для отделения хлоринов, которые присутствуют в виде примеси в препаратах синтетических мезо-тетраарилпорфиринов, полученных путем взаимодействия пиррола с бензальдегидом или его производными.

11.3.2. Металлопорфирины

При работе с соединениями этого класса необходимо соблюдать те же меры предосторожности, что и в случае водорастворимых металлопорфиринов (эти меры детально рассмотрены в разд. 11.2.2). В частности, нельзя упускать из виду то обстоятельство, что в ходе хроматографии часто происходит обмен лигандов. Кроме того, многие металлопорфирины не флуоресцируют и, следовательно, при низких концентрациях могут не обнаруживаться (разд. 11.1.2).

11.3.2.1. Эфиры металлопорфиринкарбоновых кислот

Поскольку железопорфирины (гемины) имеют важное биологическое значение, именно к ним было в первую очередь приковано внимание исследователей, и как следствие к настоящему времени накоплен большой объем информации о хроматографическом поведении этих соединений. Хотя литература, посвященная другим металлопорфинам, не столь обширна, тем не ме-

нее есть основания полагать, что опыт, приобретенный при работе с геминами, может быть непосредственно перенесен и в область хроматографии других лабильных комплексов, которые содержат ионы трехвалентных металлов и поэтому в какой-то степени проявляют ионный характер. Более того, согласно нашим данным, нейтральные металлопорфирины (т. е. содержащие двухзарядные катионы) обладают такими же хроматографическими свойствами, как и исходные порфирины, и для их разделения пригодны те же условия, что и используемые в случае деметаллированных соединений.

В работе [50] описана обращенно-фазовая хроматография метиловых эфиров железосодержащих уро-, копро-, гемато-, дейтеро-, мезо- и протопорфиринов на бумаге, пропитанной силиконовым маслом. Наилучшее разрешение было получено путем последовательного элюирования хроматограммы сначала смесью керосин — хлороформ, а затем смесью керосин — пропанол-1. В этих условиях соединения, различающиеся по числу сложноэфирных групп, полностью отделяются друг от друга, тогда как эфиры четырех порфириндикарбоновых кислот обладают одинаковой хроматографической подвижностью.

Чу и Чу [102] разделили медьсодержащие комплексы урокопро- и дейтеропорфиринов, а также медь- и цинксодержащие комплексы уропорфина на тонкослойных пластинках с силикагелем в системе *n*-декан — хлороформ (1 : 9). Как отмечалось выше, такие комплексы по своей хроматографической подвижности близки к соответствующим деметаллированным порфиринам. Превосходным методом анализа эфиров геминов является ТСХ на пластинках с полиамидом в системе бензол — уксусная кислота (9 : 1) [56]. На полиамиде были также разделены комплексы кобальта и родия [54]. По-видимому, этот сорбент пригоден и для разделения других металлопорфиринов.

Вполне приемлемое качество разделения, достигаемое с помощью ТСХ, является надежной гарантией того, что ВЭЖХ позволит получить отличные результаты. Пока известно лишь несколько примеров использования этого метода хроматографии. Так, Миллер и Малина [125] с помощью ВЭЖХ на колонке с сорбентом микропак CN (10 мкм, Varian) в режиме изократического элюирования смесью этилацетат — *n*-гептан — изопропанол (80 : 120 : 1) разделили хелаты, образованные ионами меди и метиловыми эфирами порфиринкарбоновых кислот, содержащих от двух до восьми карбоксильных групп. Подобным же образом Карлсон и др. [126] отделили медные комплексы прото- и копропорфиринов от соответствующих свободных оснований. Эти соединения хроматографировали в виде их метиловых эфиров на колонке с сорбентом μ -порасил (Waters) в системе *n*-гептан — метилацетат (3 : 1).

Удобным методом разделения метиловых эфиров геминов, особенно дизфиров, является колоночная хроматография на полиамиде в системах растворителей, предложенных Ламсоном и др. [56]. На колонках с полиамидом хроматографировали также кобальт- и родийсодержащие порфирины. Несомненно, что этот сорбент пригоден для разделения самых разнообразных металлопорфиринов. Эфиры металлопорфиринов можно разделить на колонке с оксидом алюминия в системе бензол — хлороформ [127], однако в этих условиях многие железопорфирины превращаются в μ -оксодимеры [128]. Для регенерации исходного комплекса достаточно фракцию, содержащую очищенный гемин, обработать подходящей кислотой [127]. С помощью хроматографии на оксиде алюминия было очищено множество различных комплексов ионов металлов с эфирами порфиринкарбоновых кислот. Вообще говоря, этот метод следует признать наилучшим [129—131].

В описанных выше условиях хроматографирования большинство металлопорфиринов не подвергается демеаллированию, исключение составляют лишь комплексы магния. Поскольку даже следовые количества кислоты могут привести к демеаллированию, магнийсодержащие комплексы следует хроматографировать в присутствии оснований и полностью исключить хлороформ из состава систем растворителей. Баум и Элсуорт [128] разделили диметиловые эфиры цинк- и магнийсодержащих протопорфиринов на колонке со смесью крахмала и сахарозы в системе петролейный эфир — пиридин (199 : 1).

11.3.2.2. Металлооктаалкил- и металло-мезо-тетраарилпорфирины

Опубликовано немного примеров анализа сложных смесей этих металлопорфиринов. Обычно хроматографию использовали с целью очистки основного компонента от минорных примесей порфириновой природы. Ради полноты картины отметим, что разработанный в лаборатории Корвина метод сверхкритической газовой хроматографии (краткое описание метода см. в разд. 11.3.1.2) был использован и при изучении металлопорфиринов [121, 132], однако плохое разрешение и чрезвычайная сложность аппаратного оформления отнюдь не свидетельствуют в пользу этого метода.

С помощью ТСХ на силикагеле в разнообразных системах растворителей, в состав которых наряду с уксусной кислотой и хлороформом входили также толуол и метанол, Хью и др. [133] разделили железо-, кобальт-, марганец-, цинк- и родийсодержащие комплексы мезо-тетрафенилпорфиринов. Этот метод в сочетании с масс-спектрометрией позволяет обнаружить до 10^{-14} моль

металла, однако он непригоден для разделения смеси порфириновых комплексов ртути, кадмия и свинца, поскольку последние обладают одинаковой хроматографической подвижностью. Металлосодержащие комплексы октаэтилпорфирина можно хроматографировать в тонком слое силикагеля [134] или оксида алюминия [135], используя в качестве элюента смеси толуола, хлороформа или дихлорметана с метанолом или петролевым эфиром.

Составной частью упомянутых в разд. 11.3.1.2 исследований по хроматографии порфиринов из геологических источников является работа Хаджибрахима и др. [123], в которой описана методика анализа никель- и ванадилсодержащих комплексов октаэтил- и этиопорфирина I, а также сложных смесей порфиринов нефти. Несмотря на то что достигнутое разрешение оставляет желать много лучшего, тем не менее авторы полагают, что потенциальные возможности ВЭЖХ далеко не исчерпаны и в будущем этот многообещающий метод позволит добиться значительно более эффективного разделения.

Силикагель и оксид алюминия нашли широкое применение в обычной колоночной хроматографии. Для разделения металлопорфиринов Бачлер и сотр. [134, 135] использовали колонки, заполненные как сухим, так и предварительно суспендированным в элюенте оксидом алюминия, а в качестве элюента — смесь дихлорметана с метанолом. С помощью хроматографии на сухом оксиде алюминия в хлороформе Адлер и др. [136] очистили медьсодержащий мезо-тетрафенилпорфирин. Авторы отмечают, что применение колонки с сухим сорбентом обычно позволяет получить лучшие результаты. Для очистки металлопорфиринов, особенно в тех случаях, когда разделение на силикагеле или оксиде алюминия сопровождается деметаллированием этих соединений, Хансон и др. [137] рекомендуют использовать хроматографию на сефадексе LH-20 (этот сорбент совместим с органическими растворителями) в системах хлороформ — метанол. Комплексы магния особенно склонны к деметаллированию, поэтому для очистки магнийоктаметилпорфирина использовали хроматографию на колонке со смесью магнезола и целлюлозы в системе хлороформ — пиридин [138].

11.3.3. Хлорофиллы и родственные им фотосинтезирующие пигменты

Вопросы, касающиеся выделения и очистки хлорофиллов и бактериохлорофиллов, подробно обсуждаются в критическом обзоре [139]. В этом разделе рассмотрены основные проблемы, с которыми приходится сталкиваться при разделении фотосин-

тезирующих пигментов, и приведены ссылки на последние публикации, посвященные хроматографии этих соединений.

Поскольку встречающимся в природе фотосинтезирующим пигментам всегда сопутствует целый ряд других пигментов, в том числе тетрапирролов, каротиноидов и ксантофиллов, их выделение целесообразно проводить так, чтобы на первых стадиях избавиться от основного количества примесей. Кроме того, фотосинтезирующие пигменты чрезвычайно лабильны (разд. 11.1.1), поэтому в ходе их выделения и хроматографирования необходимо соблюдать особые меры предосторожности. Описано множество систем, предназначенных для разделения хлорофиллов и других растительных пигментов с помощью колоночной хроматографии, однако в связи с появлением более эффективных методов, ТСХ и ВЭЖХ, к настоящему времени они вышли из употребления.

11.3.3.1. Тонкослойная хроматография

В работах [140—145] описаны методики разделения хлорофиллов с помощью обычной и двумерной ТСХ на целлюлозе. Для ТСХ этих соединений предложены разнообразные системы растворителей, тем не менее в большинстве случаев вполне удовлетворительные результаты можно получить, используя в качестве элюента смесь петролейного эфира или гексана с более полярным растворителем типа хлороформа, этанола или ацетона. Недавно было показано, что использование систем петролейный эфир (т. кип. 60—80 °С) — пиридин и *n*-гептан — пиридин позволяет добиться очень высокого качества разделения смесей, содержащих хлорофиллы, феофитины и феофорбиды, а также хлорин, родины и их сложные эфиры [145]. В описанных условиях хроматография протекает быстро и не сопровождается какими-либо изменениями структуры анализируемых соединений.

Сахароза является отличным сорбентом для препаративной колоночной хроматографии производных хлорофилла, а в аналитических целях были использованы тонкослойные пластинки с сахарозой [142, 146, 147]. Как и в случае ТСХ на целлюлозе, наиболее подходящими системами растворителей, в которых вероятность деструкции анализируемых соединений сведена к минимуму, являются смеси петролейного эфира с диэтиловым эфиром, пропанолом-1, пропанолом-2, ацетоном или метанолом (рис. 11.7). Пластинки с сахарозой необходимо предохранять от воздействия влаги, поскольку их контакт с водой или влажной атмосферой может привести к слипанию частиц сорбента, что с неизбежностью отразится на качестве разделения. Описаны методики одно- и двумерной ТСХ фотосинтезирующих

пигментов на силикагеле [146, 148—151], однако к интерпретации полученных результатов следует относиться с осторожностью, поскольку, как отмечено в работе [148], в ходе хроматографирования на этом сорбенте анализируемые соединения подвергаются структурным превращениям и разложению.

В качестве сорбентов для обращенно-фазовой ТСХ служат силикагель, покрытый маслом Вессона [152], обработанная

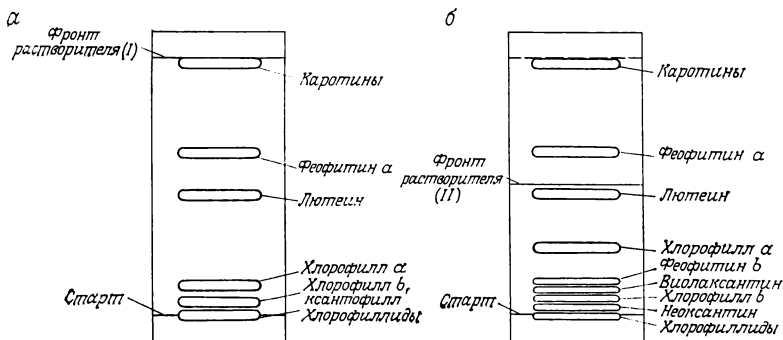


Рис. 11.7. Типичные хроматограммы экстракта растительных пигментов в тонком слое сахарозы. Пластинку последовательно элюируют сначала смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (4 : 1) (а) и затем 0,5%-ным раствором пропанола-2 в петролейном эфире (б) [147] (с разрешения авторов).

раствором ненасыщенных триглицеридов целлюлоза и кизельгур G, пропитанный триолеином, касторовым маслом или парафиновым маслом [153]. С помощью хроматографирования на импрегнированном кизельгуре в системах метанол — ацетон — изопропанол — вода можно быстро разделить и идентифицировать 18 производных хлорофиллов *a*, *b* и *c*, а также многочисленные производные бактериохлорофилла (рис. 11.8). Приведенный пример достаточно убедительно показывает, что обращенно-фазовая ТСХ, являющаяся быстрым и в то же время щадящим методом анализа, обеспечивает превосходное разрешение. Некоторые медь- и цинксодержащие комплексы феофитинов и феофорбидов были разделены на кизельгуре, покрытом арахисовым маслом, в системе метанол — вода — ацетон [152].

11.3.3.2. Колоночная хроматография

В силу того что смеси извлекаемых из растений пигментов имеют довольно сложный состав, а сами растительные пигменты являются светочувствительными соединениями и весьма склонны к разложению, идеальным методом анализа этих смесей и очистки их компонентов могла бы, по-видимому, стать

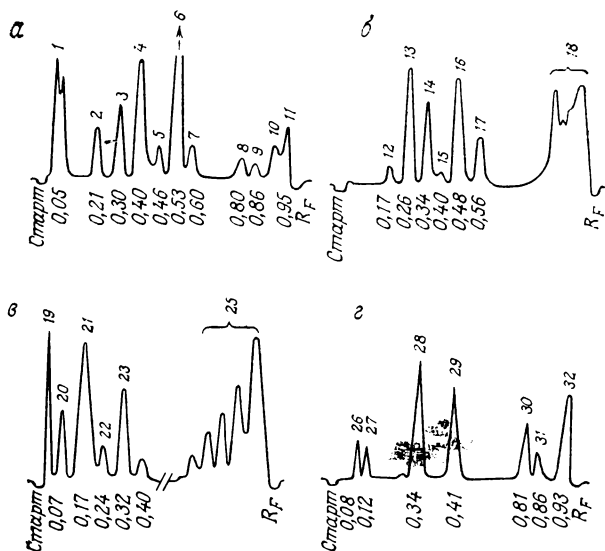


Рис. 11.8. Обращенно-фазовая ТСХ производных хлорофилла. Приведенные кривые, отражающие картину разделения компонентов анализируемой смеси, получены с помощью сканирующего флуориметра Тёрнера (оптическая схема прибора вместо монохроматора включает систему светофильтров), снабженного чувствительным к длинноволновому излучению фотоумножителем типа R136 (Hitachi; TV Corp.), тёрнеровской диафрагмой № 11 для сканирования тонкослойных хроматограмм, узкополосным светофильтром № 47В (Kodak Wratten) и широкополосным светофильтром № 2-64 (Corning). Скорость сканирования 1 см/мин [153] (с разрешения авторов).

а — сорбент: кизельгур G (размер частиц 10 мкм), пропитанный триолеином (тонкослойную пластинку с кизельгуром G обрабатывали 4%-ным раствором триолеина в петролейном эфире, а затем сушили на воздухе в течение 12 ч); элюент: метанол — ацетон — пропанол-2 — вода — бензол (30 : 10 : 5 : 5 : 1); 1 — феофитины; 2 — хлорофилл а'; 3 — хлорофилл а; 4 — алломер хлорофилла а; 5 — хлорофилл б'; 6 — хлорофилл б; 7 — алломер хлорофилла б; 8 — феофитин с; 9 — хлорофилл с; 10 — феофорбиды а и б; 11 — хлорофиллиды а и б.

б — пластинка приготовлена так же, как и для хроматограммы а, но обработана 8%-ным раствором парафинового масла (Ньюфаундленд, вязкость 125/135) в петролейном эфире; элюент: метанол — ацетон — пропанол — вода — бензол (35 : 50 : 10 : 10 : 2); 12 — феофитин а'; 13 — феофитин а; 14 — алломер феофитина а; 15 — феофитин б'; 16 — феофитин б; 17 — алломер феофитина б; 18 — хлорофиллиды, феофорбиды и хлорофиллы.

в — пластинка приготовлена так же, как и для хроматограммы а, но обработана 10%-ным раствором касторового масла в метаноле; элюент: метанол — ацетон — изопропанол — вода — бензол (160 : 5 : 5 : 30 : 4); 19 — хлорофиллы и феофитины; 20 — феофорбид а'; 21 — феофорбид а; 22 — алломер феофорбиды а; 23 — феофорбид б; 24 — алломер феофорбиды б; 25 — неизвестные хлорофиллы.

г — пластинка идентична использованной для хроматограммы а; элюент: метанол — ацетон — бензол — вода (6 : 2 : 1 : 1); 26 — феофитин а; 27 — феофитин б; 28 — хлорофилл а; 29 — хлорофилл б; 30 — феофорбид а; 31 — феофорбид б; 32 — хлорофиллиды.

ВЭЖХ. Хотя в настоящее время известно лишь немного сообщений об использовании ВЭЖХ, тем не менее даже результаты первых экспериментов позволяют предположить, что в будущем этот метод хроматографии ожидает широкое применение в качестве мощного инструмента исследований.

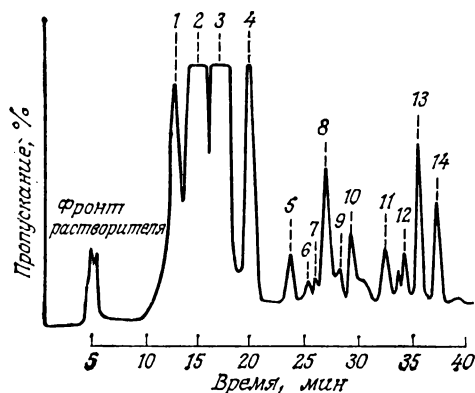
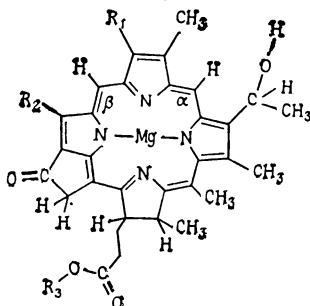


Рис. 11.9. Обращенно-фазовая ВЭЖХ 150 мг смеси бактериохлорофиллов с из *Chlorobacter limicola thiosulfatophilum* (Tassajara) [154] (с разрешения авторов). Колонка: 274,32×6,89 см; сорбент: полиэтилен FN 500, размер частиц 3—45 мкм (US Industrial Chem Co., Нью-Йорк, США); элюент: водный ацетон, градиент концентрации ацетона от 65 до 75%; скорость потока 14 мл/мин; обнаружение по поглощению длинноволнового излучения (длина оптического пути проточной кюветы 1 см; источник красного света — диод; изменение интенсивности прошедшего через кювету света регистрируют с помощью фототранзистора, максимум кривой фотоотклика которого расположен в ИК-области). Отнесение хроматографических пиков см. в таблице.



№ пика	R ₁	R ₂	R ₃
1	Et	Me	Фарнезил
2	Et	Et	Фарнезил
3	n-Pr	Et	Фарнезил
4	изо-Bu	Et	Фарнезил
5	Et	Et	4-Ундецил-2-фуранметил
6	Et	Et	Геранилгеранил
7	n-Pr	Et	4-Ундецил-2-фуранметил
8	Et	Et	9-цис-Гексадецил-1
9	n-Pr	Et	Геранилгераниол
10	n-Pr	Et	9-цис-Гексадецил-1
11	Et	Et	10,14-Тетрагидрогеранилгеранил
12	n-Pr	Et	10,14-Тетрагидрогеранилгеранил
13	Et	Et	Фитил
14	n-Pr	Et	Фитил

С помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с порошкообразным полиэтиленом в системе ацетон—вода (градиент концентрации ацетона от 67 до 75%) Чоу и др. [154] удалось разделить сложную смесь бактериохлорофиллов из *Chlorobium limicola thiosulfatophilum*. Это разделение примечательно тем, что достигнуто удовлетворительное разрешение хроматографических пиков, отвечающих очень близким по своей структуре соединениям, молекулы которых различаются лишь

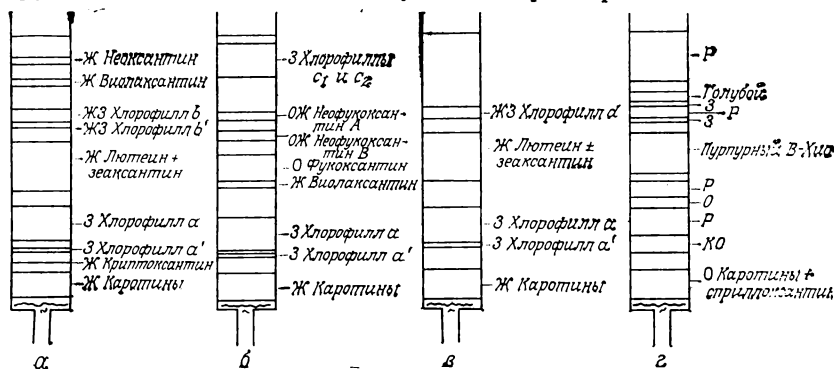


Рис. 11.10. Типичные картины разделения пигментов из зеленых растений (а), бурых водорослей (б), красных водорослей (в) и серых пурпурных бактерий (г) на колонке с порошкообразной сахарозой в петролейном эфире, содержащем от 0,5 до 2% пропанола-1; буквами обозначены цвета пигментов: Ж — желтый, З — зеленый, ЖЗ — желтовато-зеленый; О — оранжевый, ОЖ — оранжево-желтый, Р — розовый, КО — красно-оранжевый [139] (с разрешения авторов).

на одно метиленовое звено или на одну двойную связь (рис. 11.9). ВЭЖХ на полиэтилене в водном ацетоне использовали также в качестве метода быстрой очистки хлорофилла а из шпината [139].

Для колоночной хроматографии хлорофиллов можно использовать те же системы растворителей, что и для ТСХ этих соединений (разд. 11.3.3.1), а в качестве сорбентов — сахарозу [146, 155—158], целлюлозу [140, 146, 148, 159—163], крахмал [140, 146, 148], полиамид [164], полиэтилен [153, 158] и полипропилен [160]. Судя по нашему опыту, наилучшие результаты получаются на колонках, наполненных сухим сорбентом (порошкообразной коммерческой сахарозой, содержащей 3% крахмала, который добавляют, чтобы предотвратить спекание сорбента) и элюируемых смесью петролейного эфира с пропанолом-1 или диэтиловым эфиром (рис. 11.10). По окончании хроматографирования растворитель удаляют путем отсасывания, а сорбент выталкивают из колонки и разрезают на соответствующие зоны. Вещества экстрагируют эфиром или, если необ-

ходимо выделить полярные соединения, дихлорметаном, к которому можно добавить следовые количества пиридина.

Ионообменные смолы следует использовать с осторожностью, поскольку при высоких и низких значениях pH хлорофиллы претерпевают различные превращения и в конечном итоге разлагаются. Однако в случае выделения больших количеств хлорофиллов *a*, *b* и *c* ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе, по-видимому, предпочтительнее хроматографии на колонках с сахарозой, так как характеризуется сравнительно более высокой скоростью [165]. Описан способ отделения хлорофиллов от каротиноидов с помощью гель-хроматографии на полистироле [116, 167]. Недавно предложена методика очистки хлорофиллов *a* и *b* на сефасорбе HP марки «сверхтонкий С» (Pharmacia, Bromma, Швеция), который по своей структуре аналогичен сефадексу LH-20, в системе диэтиловый эфир—гексан (1 : 9) с последующим добавлением к элюенту ацетона до концентрации 0,5% [168]. Этот метод хроматографии более совершенен, чем описанные ранее, в которых был использован сефадекс LH-20 [146, 169].

11.3.4. Желчные пигменты

Желчные пигменты являются линейными тетрапирролами, которые образуются в результате расщепления и последующих превращений порфиринов. Описано около тридцати различных методов разделения билирубина и биливердина и их сложных эфиров с помощью ТСХ на силикагеле [170]. Эти соединения в виде свободных карбоновых кислот можно хроматографировать на пластинках с силикагелем в системе хлороформ—уксусная кислота (99 : 1) или на полиамидных пластинках в метаноле, содержащем 1% концентрированного NH_4OH [170]. Диметилвые эфиры биливердинов также можно разделить на силикагеле, однако в данном случае из состава сорбента нельзя исключать сульфат кальция, ибо он не только является связующим, но и играет активную роль в хроматографическом процессе [171]. На силикагеле G были разделены α -, β -, γ - и δ -изомеры прото- и мезобиливердинов [120]. Показано, что этот сорбент пригоден для хроматографирования сложных эфиров билирубина в таких системах растворителей, как бензол—этанол [172—174], бензол—хлороформ или хлороформ—этилацетат [161, 162].

Пока известно лишь несколько примеров использования ВЭЖХ для разделения желчных пигментов, однако, несмотря на немногочисленность таких работ, они достаточно убедительно свидетельствуют о широких возможностях этого метода. В частности, с помощью ВЭЖХ на сорбенте корасил II в си-

стеме метилацетат — изооктан (1:2) в режиме программирования скорости потока элюента была разделена сложная смесь желчных пигментов в виде их диметилловых эфиров [163].

Благодарности

При подготовке настоящего обзора автору была оказана помощь со стороны Национальных институтов здравоохранения США (AM 17989) и Канадского национального комитета по науке и технике. Автор выражает также глубокую благодарность сотрудникам химического факультета Гарвардского университета за помощь в подготовке этой рукописи к печати.

Литература

1. Dolphin D. (Editor), The Porphyrins, Vols. 1—7. — New York: Academic Press, 1978—1979.
2. Tsvet M. Ber. Deut. Bot. Ges., **24**, 384 (1906).
3. Blumer M. Anal. Chem., **28**, 1640 (1956).
4. Connelly J. L., Morrison M., Stotz E. J. Biol. Chem., **233**, 743 (1958).
5. Owen J. A., Silberman H. J., Got C. Nature (London), **182**, 1373 (1958).
6. Doss M. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., **8**, 197 (1970).
7. Carlson R. E., Dolphin D. — In: Porphyrins in Human Diseases./Ed. Doss M. — Basel: Karger, 1976, p. 465.
8. Slavin W., Rhys Williams A. T., Adams A. F. J. Chromatogr., **134**, 121 (1977).
9. Nicholas R. E. H., Rimington C. Biochem. J., **48**, 306 (1951).
10. Kehl R., Stich W. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **289**, 6 (1951).
11. Eriksen L. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **5**, 155 (1953).
12. Mauzerall D. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 2601 (1960).
13. Belcher R. V., Smith S. G., Mahler R., Campbell J. J. Chromatogr., **53**, 279 (1970).
14. With T. K. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **9**, 395 (1957).
15. Eales L. — In: The Porphyrins, Vol. 6./Ed. Dolphin D. — New York: Academic Press, 1979, p. 663.
16. Russell C. S. J. Chromatogr., **25**, 163 (1966).
17. Gajdos-Török M. Bull. Soc. Chim. Biol., **50**, 925 (1968).
18. Yuan M., Russell C. S. J. Chromatogr., **87**, 562 (1973).
19. Mundschenk M. J. Chromatogr., **25**, 380 (1966).
20. Jensen J. J. Chromatogr., **10**, 236 (1963).
21. With T. K. Clin. Biochem., **1**, 30 (1967).
22. With T. K. J. Chromatogr., **42**, 389 (1969).
23. Okuda T., Nakajima H., Yatsuki K., Amano M., Umeda G. Brit. J. Ind. Med., **35**, 61 (1978).
24. Ellfolk N., Sievers G. J. Chromatogr., **25**, 373 (1966).
25. Evans N., Games D. E., Jackson A. H., Matlin S. A. J. Chromatogr., **115**, 325 (1975).
26. Bonnett R., Charalambides A. A., Jones K., Magnus I. A., Ridge R. J. Biochem. J., **173**, 693 (1978).
27. Bommer J. C., Burnham B. F., Carlson R. E., Dolphin D. Anal. Biochem., **95**, 444 (1979).
28. Eriksen L. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **9**, 97 (1957).
29. Lemberg R., Steward M. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., **33**, 451 (1955).

30. Morell D. B., Barrett J., Clezy P. S. *Biochem. J.*, **78**, 793 (1961).
31. Fischer H., Hofmann H. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, **246**, 15 (1937).
32. Cornford A. *Biochem. J.*, **44**, 111 (1949).
33. With T. K. S. *Afr. Med. J.*, special issue *Lab. Clin. Med.*, **17**, 227 (1971).
34. Chu T. C., Chu E.-J. *J. Biol. Chem.*, **227**, 505 (1957).
35. Chu T. C., Chu E.-J. *Anal. Chem.*, **30**, 1678 (1958).
36. Chu T. C., Chu E.-J. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2741 (1959).
37. Chu T. C., Chu E.-J. *Biochem. J.*, **83**, 318 (1962).
38. Popper T. L., Tupply H. *Acta Chem. Scand.*, **17**, 547 (1963).
39. Nicholas R. E. H. *Biochem. J.*, **48**, 309 (1951).
40. Schwartz S., Stephenson B., Sarkar D. *Clin. Chem.*, **22**, 1057 (1976).
41. Mundschenk H. *J. Chromatogr.*, **38**, 106 (1968).
42. Mundschenk H. *J. Chromatogr.*, **37**, 431 (1968).
43. Loev B., Goodman M. M. *Progr. Separ. Purif.*, **3**, 73 (1970).
44. DiNello R. K., Chang C. K. — In: *The Porphyrins*/Ed. Dolphin D., Vol. 1. — New York: Academic Press, 1978, p. 289.
45. Heikel T. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **10**, 193 (1958).
46. Rimington C., Belcher R. V. *J. Chromatogr.*, **28**, 112 (1967).
47. Busby C. A., DiNello R. K., Dolphin D. *Can. J. Chem.*, **53**, 1554 (1975).
48. Ramsay W. N. *Anal. Biochem.*, **7**, 366 (1964).
49. Yoshida M., Shimazono N. *J. Biochem.*, **58**, 39 (1965).
50. Chu T. C., Chu E.-J. *J. Biol. Chem.*, **212**, 1 (1955).
51. Warne P. K., Hager L. *Biochemistry*, **9**, 1599 (1970).
52. Miyauchi C. *Proc. Jap. Acad.*, **45**, 72 (1969).
53. DiNello R. K., Dolphin D. *Anal. Biochem.*, **64**, 444 (1975).
54. Srivastava T. S., Yonetani T. *Chromatographia*, **8**, 124 (1975).
55. Lamson D. W., Yonetani T. *Anal. Biochem.*, **52**, 470 (1973).
56. Lamson D. W., Coulson A. F. W., Yonetani T. *Anal. Chem.*, **45**, 2273 (1973).
57. Kiese M., Kurz H. *Biochem. Z.*, **325**, 299 (1954).
58. Barrett J. *Biochem. J.*, **64**, 626 (1956).
59. Morrison M., Stotz E. *J. Biol. Chem.*, **213**, 373 (1955).
60. Caughey W. S., York J. L. *J. Biol. Chem.*, **237**, PC2414 (1962).
61. Wilchek M. *Anal. Biochem.*, **49**, 572 (1972).
62. Smith K. M. (Editor), *Porphyrins and Metalloporphyrins*. — Amsterdam, Elsevier, 1975.
63. Caughey W. S., Alben J. O., Fujimoto W. Y., York J. L. *J. Org. Chem.*, **31**, 2631 (1966).
64. Winkelman J., Slater G., Grossman J. *Cancer Res.*, **27**, 2060 (1967).
65. Winkelman J. *Cancer Res.*, **22**, 589 (1962).
66. Pasternak R. F., Huber P. R., Boyd P., Engasser G., Francesconi L., Gibbs E., Fasella P., Ventura G. C., Hinds L. de C. *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 4511 (1972).
67. Chu T. C., Green A. A., Chu E. J.-H. *J. Biol. Chem.*, **190**, 643 (1951).
68. Bogorad L., Granick S. *J. Biol. Chem.*, **202**, 793 (1953).
69. Barrett J. *Nature (London)*, **183**, 1185 (1959).
70. Chu T. C., Chu E. J.-H. *J. Biol. Chem.*, **208**, 537 (1954).
71. Falk J. E., Dresel E. I. B., Benson A., Knight B. C. *Biochem. J.*, **63**, 87 (1956).
72. Falk J. E., Benson A. *Biochem. J.*, **55**, 101 (1953).
73. Bogorad L., Marks G. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 356 (1960).
74. Cornford P. A. D., Benson A. *J. Chromatogr.*, **10**, 141 (1963).
75. Battle A. M. de C., Benson A. *J. Chromatogr.*, **25**, 117 (1966).
76. White W. I., Bachmann R. C., Burnham B. F. — In: *The Porphyrins*, Vol. 1./Ed. Dolphin D. — New York: Academic Press, 1978, p. 553.

77. Doss M. — In: *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*, Vol. 3./Eds. Niederwieser A., Pataki G. — MI, Ann Arbor: Ann Arbor Sci. Publ., 1972, p. 145.
78. Pinol Aguadé J., Herrero C., Almeida J., Smith S. G., Belcher R. V. *Brit. J. Dermatol.*, **93**, 277 (1975).
79. With T. K. *Dan. Med. Bull.*, **22**, 74 (1975).
80. Smith S. G. *Brit. J. Dermatol.*, **93**, 291 (1975).
81. Sears W. G., Darocha T., Eales L. *Enzyme*, **17**, 69 (1974).
82. Elder G. H. *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, **17**, 45 (1971).
83. Elder G. H. *J. Chromatogr.*, **59**, 234 (1971).
84. Heller S. R., Labbé S. F., Nutter J. *Clin. Chem.*, **17**, 525 (1971).
85. Doss M. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 197 (1970).
86. Doss M. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 208 (1970).
87. Elder G. H., Chapman J. R. *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 535 (1970).
88. Doss M. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **7**, 133 (1969).
89. Doss M. *Hopper-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 499 (1969).
90. Doss M. *J. Chromatogr.*, **30**, 234 (1971).
91. Doss M. *Klin. Wochenschr.*, **47**, 1281 (1969).
92. Cardinal R. A., Bossenmaier I., Petryka Z. J., Johnson L., Watson C. J. *J. Chromatogr.*, **38**, 100 (1968).
93. Doss M., Bode U. *J. Chromatogr.*, **35**, 248 (1968).
94. Doss M. *Deut. Med. Wochenschr.*, **93**, 2223 (1968).
95. Doss M., Bode U. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **6**, 383 (1968).
96. Doss M. *Klin. Wochenschr.*, **46**, 731 (1968).
97. Doss M. *Z. Klin. Chem. Clin. Biochem.*, **6**, 498 (1968).
98. Burbridge P. A., Collier C. L., Jackson A. H., Kenner G. W. *J. Chem. Soc. B*, 930 (1967).
99. Chu T. C., Chu E. J.-H. *J. Chromatogr.*, **28**, 475 (1967).
100. Doss M. *J. Chromatogr.*, **30**, 265 (1967).
101. Henderson R. W., Morton T. C. *J. Chromatogr.*, **27**, 180 (1967).
102. Chu T. C., Chu E. J.-H. *J. Chromatogr.*, **21**, 46 (1966).
103. Demole E. *J. Chromatogr.*, **1**, 24 (1958).
104. Grosser Y., Sweeney G. D., Eales L. *S. Afr. Med. J.*, **41**, 460 (1967).
105. Edmondson P. R., Schwartz S. J. *Biol. Chem.*, **205**, 605 (1953).
106. Wilson J. H. P., van den Berg J. W. O., Edixhoven A., van Gastel-Quist L. H. M. *Clin. Chim. Acta*, **89**, 165 (1978).
107. Carlson R. E., Dolphin D. — In: *High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*./Eds. Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. — London: Academic Press, 1976, p. 87.
108. Evans N., Jackson A. H., Matlin S. A., Towill R. J. *J. Chromatogr.*, **125**, 345 (1976).
109. Evans N., Jackson A. H., Matlin S. A., Towill R. — In: *High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*./Eds. Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. — London: Academic Press, 1976, p. 71.
110. Gray C. H., Lim C. K., Nicholson D. C. — In: *High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*./Eds. Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. — London: Academic Press, 1976, p. 79.
111. Battersby A. R., Buckley D. G., Hodgson G. L., Markwell R. E., McDonald E. — In: *High Pressure Liquid Chromatography in clinical Chemistry*./Eds. Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. — London: Academic Press, 1976, p. 63.
112. Watson G. J., Schwartz S., Hawkinson V. J. *Biol. Chem.*, **157**, 345 (1945).
113. Hill R. *Biochem. J.*, **19**, 341 (1925).
114. Fuhrhop J.-H., Smith K. M. — In: *Porphyrins and Metalloporphyrins*./Ed. Smith K. M. — Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 757.
115. Bachmann R. C., Burnham B. F. cited in ref. 77.
116. Grinstein M. J. *Biol. Chem.*, **167**, 515 (1947).

117. O'Keefe D. H. Ph. D. Thesis. — AZ, Tempe: Arizona State University, 1974.
118. Inhoffen H. H., Bliesenner K., Brockmann H., Jr., Tetrahedron Lett., 727 (1967).
119. Lemberg R., Parker J. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 30, 163 (1952).
120. Lucas J., Orten J. M. J. Biol. Chem., 191, 287 (1951).
121. Karayannis N. M., Corwin A. H. Anal. Biochem., 26, 34 (1968).
122. Dunning H. N., Carlton J. K. Anal. Chem., 28, 1362 (1956).
123. Hajibrahim S. K., Tibbetts P. J. C., Watts C. D., Maxwell J. R., Eglington G. Anal. Chem., 50, 549 (1978).
124. Adler A. D., Longo F. R., Kampas F., Kim J. J. Inorg. Nucl. Chem., 32, 2443 (1970).
125. Miller V., Malina L. J. Chromatogr., 145, 290 (1978).
126. Carlson R. E., Dolphin D., Bernstein M. Clin. Chem., 24, 2009 (1978).
127. Chang C. K., DiNello R. K., Dolphin D. — In: Inorganic Syntheses, Vol. 20./Ed. Bush D. H. — New York: Wiley, 1980, p. 147.
128. Baum S. J., Ellsworth R. K. J. Chromatogr., 47, 503 (1970).
129. Alben J. O., Fuchsman W. H., Beaudreau C. A., Caughey W. S. Biochemistry, 7, 624 (1968).
130. McLees B. D., Caughey W. S. Biochemistry, 7, 642 (1968).
131. Boucher L. J., Katz J. J. Amer. Chem. Soc., 89, 1340 (1967).
132. Karayannis N. M., Corwin A. H. J. Chromatogr., 47, 247 (1970).
133. Hui K. S., Davis B. A., Boulton A. A. J. Chromatogr., 115, 581 (1975).
134. Buchler J. W., Puppe L., Rohbock K., Schneehage H. H. Chem. Ber., 106, 2710 (1973).
135. Buchler J. W., Lay K. L. Inorg. Nucl. Chem. Lett., 10, 297 (1974).
136. Adler A. D., Longo F. R., Váradí V. — In: Inorganic Syntheses, Vol. 16./Ed. F. Basolo. — New York: McGraw Hill, 1976, p. 213.
137. Hanson L. K., Gouterman M., Hanson J. C. J. Amer. Chem. Soc., 95, 4822 (1973).
138. Wei P. E., Corwin A. H., Arellana R. J. Org. Chem., 27, 3344 (1962).
139. Svec W. A. — In: The Porphyrins, Vol. 5./Ed. Dolphin D. — New York: Academic Press, 1979, p. 341.
140. Mattox K. R., Williams J. P. J. Phycol., 1, 191 (1965).
141. Sherma J. Anal. Lett., 3, 35 (1970).
142. Jeffrey S. W. Biochim. Biophys. Acta, 162, 271 (1968).
143. Bacon M. F. J. Chromatogr., 17, 322 (1965).
144. Lynn D. Y. C., Schanderl S. H. J. Chromatogr., 26, 442 (1967).
145. Sievers G., Hynninen P. H. J. Chromatogr., 134, 359 (1977).
146. Strain H. H., Svec W. A. Advan. Chromatogr., 8, 119 (1969).
147. Chan A. S. K., Ellworth R. K., Perkins H. J., Snow S. E. J. Chromatogr., 47, 395 (1970).
148. Strain H. H., Sherma J. J. Chem. Educ., 46, 476 (1969).
149. Schaltegger K. J. Chromatogr., 19, 75 (1965).
150. Sherma J. J. Chromatogr., 52, 177 (1970).
151. Schanderl S. H., Lynn D. Y. C. J. Food Sci., 31, 141 (1966).
152. Jones I. D., Butler L. S., Gibbs E., White R. C. J. Chromatogr., 70, 87 (1972).
153. Daley R. J., Gray C. B. J., Brown S. R. J. Chromatogr., 76, 175 (1973).
154. Chow H.-C., Caple M. B., Strouse C. E. J. Chromatogr., 151, 357 (1978).
155. Strain H. H., Svec W. A. — In: Chromatography./Ed. Heftman E. 3rd Edn. — New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 744.
156. Strain H. H., Cope B. T., Svec W. A. Methods Enzymol., 23, 452 (1971).
157. Strain H. H., Svec W. A. — In: The Chlorophylls./Eds. Vernon L. P., Seely G. R. — New York: Academic Press, 1966, p. 21.
158. Anderson A. F. H., Calvin M. Nature (London), 194, 285 (1962).
159. Smith W. F., Jr., Eddy K. L. J. Chromatogr., 22, 296 (1966).
160. Strain H. H., Sherma J., Grandolfo M. Anal. Biochem., 24, 54 (1968).

161. Kuenzle C. C., Wieber M. H., Pelloni R. *Biochem. J.*, **133**, 357 (1973).
162. Kuenzle C. C. *Biochem. J.*, **119**, 395 (1970).
163. Stoll M. S., Lim C. K., Gray C. H. — In: *High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*/Eds. Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. — London: Academic Press, 1976, p. 97.
164. Frič F., Haspel-Horvatovič E. J. *Chromatogr.*, **68**, 264 (1972).
165. Sato N., Murata N. *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 103 (1978).
166. Zwolenik J. J. Пат. США 3514467 (Cl. 260—314; CO96) (1970).
167. Argyroudi-Akoyunoglou J. H., Akoyunoglou G. *Photosynthetica*, **5**, 153 (1971).
168. Iriyama K., Yoshiura M., Shiraki M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 406 (1979).
169. Shimizu S. J. *Chromatogr.*, **59**, 440 (1971).
170. McDonagh A. F. — In: *The Porphyrins*, Vol. 6/Ed. Dolphin D. — New York: Academic Press, 1979, p. 293.
171. O'Carra P., Collieran E. J. *Chromatogr.*, **50**, 458 (1970).
172. Eivazi F., Hudson M. F., Smith K. M. *Tetrahedron Lett.*, 3837 (1976).
173. Fatiadi A. J., Schaffer R. *Experientia*, **27**, 1139 (1971).
174. Rudinger W. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1291 (1969).

Глава 12

Фенольные соединения

Джеффри Б. Харборн

12.1. Введение

Первые методики хроматографии фенольных соединений были разработаны Каррером и Стронгом [1], которые еще в 1930 г. описали разделение смесей антоцианов на колонках с сульфатом кальция и оксидом алюминия. Однако в данной области исследований хроматографические методы завоевали достаточно прочные позиции лишь после 1948 г., когда Бейт-Смит [2] для разделения этих пигментов использовал распределительную хроматографию на бумаге. Пожалуй, нельзя назвать ни одного другого такого класса природных соединений, за исключением аминокислот и сахаров, которые можно было бы столь же легко разделить и идентифицировать с помощью бумажной хроматографии. Отчасти это обусловлено хорошей растворимостью полифенолов, а отчасти тем, что для обнаружения большинства из них не нужны окрашивающие реагенты. В последние годы в практику исследований введены и другие методы хроматографии, однако по-прежнему, наиболее важным методом разделения этих соединений остается бумажная хроматография.

Среди более новых методов хроматографии, безусловно, наиболее гибким является метод ТСХ, который, как оказалось, особенно удобен при разделении фенолов различных классов (например, ароматических оксикислот и метилированных флавоноидов), с трудом поддающихся разделению с помощью бумажной хроматографии. Довольно подробно изучены возможности применения ГЖХ [3, 4], которая, безусловно, представляет собой наилучший метод разделения смесей простых и сравнительно летучих фенолов. ВЭЖХ широко используют для разделения флавоноидов [5], и, по-видимому, этот метод позволит осуществить количественный анализ нелетучих растительных полифенолов. Наконец, электрофорез на бумаге [6] и обычная колоночная хроматография [7, 8] также играют важную роль в этой области исследований, хотя применение их ограничено.

Термин «фенольные соединения» объединяет широкий круг природных веществ [9], среди которых можно выделить две основные группы: простые фенольные соединения и флавоноиды. К первой группе относятся фенолы, например пирокатехин и резорцин, фенолкарбоновые кислоты, например протокатеховая и сиреневая кислоты, а также оксикоричные кислоты и их лактоны, называемые кумаринами. К флавоноидам относятся широко распространенные водорастворимые пигменты — антоцианы и флавоны — и множество родственных соединений, например изофлавоны, катехины, танины и бифлавонылы [10]. Кроме того, в настоящей главе описано разделение пигментов растительного и животного происхождения, имеющих хиноидную структуру [11], и родственных им растительных ксантонов. Разделение фенольных соединений, в состав которых входят азотсодержащие функциональные группы, в данной главе подробно не рассматривается, хотя эти соединения играют важную роль.

12.2. Бумажная хроматография

12.2.1. Системы растворителей

Системы растворителей, наиболее часто используемые для разделения фенолов на бумаге, приведены в табл. 12.1. Строгое соблюдение указанных в таблице соотношений растворителей не имеет решающего значения; более того, меняя их, можно улучшить разрешение. Так, например, гомогенная система *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (6:1:2) столь же эффективна, как и значительно чаще применяемая смесь тех же растворителей, взятых в соотношении 4:1:5 (BAW), однако значения R_f фенолов в первой системе, как правило, ниже, чем во второй. Систему BAW можно заменить на систему *трет*-бутанол — уксусная кислота — вода (3:1:1) [12], правда, длительность элюирования при этом увеличивается. Следует также упомянуть хорошо известные стандартные системы, используемые для определения R_f новых соединений с целью сравнения найденных значений R_f с опубликованными данными. Наиболее важными с этой точки зрения являются следующие системы растворителей: BAW, уксусная кислота — конц. HCl — вода (30:3:10) (Forestal), водный фенол, вода, 2—6%-ная уксусная кислота и 1%-ная соляная кислота.

Здесь уместно привести некоторые практические рекомендации, которые необходимо соблюдать при работе с перечисленными хроматографическими системами. Смеси BAW можно применять либо непосредственно после приготовления, либо через 1—3 дня, однако при этом следует учитывать, что значе-

Таблица 12.1. Системы растворителей, предназначенные для бумажной хроматографии фенолов^а

Состав (и сокращенное обозначение)	Соотношение компонентов (по объему)	Разделяемые соединения
<i>n</i> -Бутанол — уксусная кислота — вода (BAW)	4 : 1 : 5 (верхний слой)	Фенолы всех классов
<i>n</i> -Бутанол — этанол — вода (BEW)	20 : 5 : 11 (гомогенная смесь)	Большинство гликозилированных флавоноидов
<i>n</i> -Бутанол — 2 н. HCl (BuHCl)	1 : 1 (верхний слой)	Антоцианы ^б
<i>n</i> -Бутанол — 2 н. NH ₄ OH (BN)	1 : 1 (верхний слой)	Оксикоричные кислоты, кумарин, ксантон, бифлавонылы и простые фенолы
Фенол — вода (PhOH)	4 : 1 (гомогенная смесь)	Многие флавоноиды, особенно частично метилированные производные
Бензол — пропионовая кислота — вода (BPA)	2 : 2 : 1 (верхний слой)	Фенолкарбоновые кислоты
Бензол — уксусная кислота — вода	125 : 72 : 3 (гомогенная смесь)	Изофлавоны и метилированные флавоны
Пропанол-2 — аммиак — вода (PAW)	8 : 1 : 1 (гомогенная смесь)	Фенолкарбоновые кислоты
Уксусная кислота — конц. HCl — вода (Forestal) ^в	30 : 3 : 10 (гомогенная смесь)	Большинство агликонов флавоноидов
Вода или 5—15%-ная уксусная кислота	—	Большинство гликозилированных флавоноидов, простые фенолы и флавоны
Хлороформ — уксусная кислота — вода	13 : 6 : 1 (гомогенная смесь)	Флавонолы

^а Элюирование перечисленными системами растворителей должно проводиться не дольше 18—24 ч, элюирование водными смесями — не дольше 2—4 ч, системой PAW — не дольше 6—8 ч.

^б Антоцианы обесцвечиваются в отсутствие HCl или AsOH.

^в Для разделения агликонов флавоноидов, кроме антоцианидинов, можно использовать различные смеси уксусной кислоты с водой.

ния R_f зависят от времени уравнивания фаз. Работая со смесями, содержащими *n*-бутанол и воду, например со смесью типа *n*-бутанол — 2 н. гидроксид аммония (1 : 1) (BN) и *n*-бутанол — 2 н. HCl (1 : 1) (BuHCl), необходимо дождаться установления равновесия между верхним и нижним слоями смеси растворителей и насыщения парами элюента атмосферы хроматографической камеры. Однако предварительное уравнивание систем бензол — уксусная кислота — вода нежелательно, поскольку только в свежеприготовленных системах разделяемые соединения не образуют «хвостов» [13, 14].

Хотя перечисленные в табл. 12.1 системы растворителей в большинстве случаев обеспечивают очень хорошее разрешение, тем не менее они практически непригодны для разделения простых фенолов. Соединения типа ванилина и эвгенола можно разделить на бумаге шляйхер-шюльц 2043b, используя в качестве неподвижной фазы смесь диметилформамид — ацетон (3:1), а в качестве подвижной фазы смесь циклогексан — этилацетат (5:1) [15]. Простые фенолы можно также хроматографировать на бумаге ватман № 7, пропитанной раствором борной кислоты в 1 н. NaOH, элюируя их смесью BN [16]. Альтернативный подход к анализу смеси фенолов заключается в их превращении в производные *n*-нитрофенилазобензола [17]. Однако разделение фенолов лучше проводить при помощи тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии (см. разд. 12.4 и 12.6).

12.2.2. Цветные реакции

В табл. 12.2 в краткой форме описаны наиболее употребительные методы обнаружения фенольных соединений на бумаге. Обычный просмотр хроматограмм, обработанных или не обработанных парами аммиака, при УФ-освещении является вполне удовлетворительным способом локализации и предварительного обнаружения этих соединений. Перечисленные в таблице реагенты дают довольно устойчивое окрашивание, поэтому хроматограммы, предназначенные для использования в качестве эталонных, можно хранить практически неограниченно долго. Чтобы подтвердить правильность результатов предварительного обнаружения анализируемых соединений, а также установить, присутствуют ли в их молекулах те или иные структурные группы, вторую хроматограмму, идентичную первой, обрабатывают селективными окрашивающими реагентами. Методики приготовления и применения этих реагентов и цветные реакции на отдельные фенолы подробно описаны в работах [18—24].

12.2.3. Флавоноиды

Как уже отмечалось выше, бумажная хроматография является идеальным методом разделения флавоноидных пигментов. Кроме того, подвижность флавоноидов на бумаге подчиняется строгим закономерностям, что позволяет с помощью соответствующих корреляционных уравнений описать связь между хроматографическими свойствами и химической структурой этих соединений. Можно вычислить значения R_m для известных веществ и использовать эти значения для предсказания

Таблица 12.2. Цветные реакции различных фенолов на бумаге

Реагент	Спектральный диапазон источника света	Цвет	Класс обнаруживаемых фенолов
Пары аммиака или 2 н. раствор Na_2CO_3	Видимая область	Оранжевый, фуксиновый, розовато-лиловый	Антоцианы, бетацианы
		Ярко-желтый	Халконы, ауруны
		Бледно-желтый	Флавоны, ксантоны
	УФ, 253 нм	Темные пятна на флуоресцирующем фоне	Простые фенолы, изофлавоны, флавоны
	УФ, 300 нм	Бледно-коричневый	Флавонол-3-гликозиды, флавоны
		Абрикосовый	Ксантоны
		Ярко-желтый	Флавоны, содержащие свободную 3-ОН-группу
		Желто-зеленая флуоресценция	Флавоны, лишенные 5-ОН-группы
		Желтая флуоресценция	Цихориин и т. п.
		Голубая флуоресценция	3,5-Диметоксифлавонолы, кумарины и коричные кислоты
	УФ, 300 нм	Изменение цвета	Большинство фенолов
		Появление синей окраски	п-Кумаровая кислота, флороглюцин и т. п.

FeCl ₃ /K ₃ Fe(CN) ₆	Видимая область	Исчезновение синей окраски	Метилированные коричные кислоты
Диазотированный <i>p</i> -нитроанилин	Видимая область	Флуоресценция	Кумарины и подобные соединения
Аммиачный раствор AgNO ₃	Видимая область	Синий	Все фенольные соединения
Молибдат натрия	Видимая область	Желтый, коричневый или красный	Большинство фенольных соединений
Ванилин и <i>p</i> -толуолсульфокислота	Видимая область	Восстановление окраски на холоду	<i>o</i> -Диоксисоединения
		Желтый	<i>o</i> -Диоксисоединения
		Красно-фиолетовый	Флороглюцин и его производные
Боргидрид этиловый AlCl ₃	Видимая область	Бледно-розовый (после нагревания)	Пирокатехин и его производные
<i>p</i> -Толуолсульфокислота	Видимая область	Красный	Только флавононы
Бромфеноловый голубой	Видимая область	Красный или оранжевый (после нагревания при 105 °C в течение 10 мин)	Только флавандиолы-3,4
2,4,5-Тринитрофенол в C ₂ H ₅ OH/этанольный раствор КОН	Видимая область	Желтый на голубом фоне	Фенолкарбоновые кислоты
		Красный	Только флаванолы-3 (катехины)

хроматографического поведения новых соединений. Подвижность флавоноидов зависит главным образом от числа гидроксильных и метильных групп и углеводных остатков в их молекулах. Например, с увеличением степени гидроксирования подвижность этих соединений уменьшается во всех системах растворителей.

Зависимость между степенью гидроксирования и значениями R_f в системе бензол — уксусная кислота — вода выполняется столь строго, что по найденным значениям R_f можно оценить число свободных фенольных групп в молекулах флавоноидов с известной структурой [25]. Важное значение имеют также и другие структурные особенности флавоноидов, например планарность молекулы. Так, флавоноиды, имеющие плоскую структуру (флавонолагликоны, халконы, ауруны и т. п.), можно отделить от некомпланарных соединений (таких, как флавонол-3-гликозиды, флавононы, катехины и т. п.), поскольку подвижность последних в водных растворителях близка к нулю.

В ходе дальнейшего обсуждения мы остановимся лишь на нескольких примерах, иллюстрирующих широкие возможности бумажной хроматографии как метода разделения близкородственных флавоноидов, а также связь между хроматографическим поведением и структурой этих соединений. Более подробно эти аспекты рассмотрены в работе [20].

12.2.4. Антоцианы

В настоящее время известно более 200 природных антоцианов [10, 19], и, поскольку эти пигменты не имеют четких точек плавления и далеко не всегда различаются по своим спектральным свойствам, важное значение для их характеристики приобретают величины R_f . Структурное многообразие антоцианов обусловлено главным образом наличием в их молекулах углеводных остатков. Природа и число этих остатков, а также положение гликозильрованных фенольных групп в структуре антоцианидинового хромофора, являющегося остовом всей молекулы, определяют хроматографические свойства этих соединений (см. табл. 12.3).

Из данных, приведенных в табл. 12.3, видно, что гликозильрование приводит к уменьшению значений R_f в системах растворителей, содержащих бутанол (BAW и BuHCl), и к увеличению R_f в водных системах, причем с увеличением числа остатков глюкозы (и практически независимо от их положения в молекуле) хроматографическая подвижность цианидинглюкозидов либо систематически уменьшается (в системах BAW и BuHCl), либо возрастает (в 1%-ной HCl и в системе AAN).

Таблица 12.3. Бумажная хроматография гликозилированных цианидинов в различных системах растворителей^а

Цианидингликозиды	hR_f			
	BAW	BuHCl	1%-ная HCl	AAH
Агликон	68	72	0	3
3-Глюкозид	23	23	6	24
5-Глюкозид	32	43	6	24
7-Глюкозид	34	27	4	20
3'-Глюкозид	—	44	2	15
3,5-Диглюкозид	14	4	13	40
3,7-Диглюкозид	11	3	20	49
3,3'-Диглюкозид	16	7	20	49
3-Софорозид-5-глюкозид	15	6	53	75
3,7,3'-Триглюкозид	8	1	47	67

^а Состав систем растворителей BAW и BuHCl см. в табл. 12.1; AAH: уксусная кислота — конц. HCl — вода (15 : 3 : 82).

Однако, если углеводные остатки различаются по своей природе или по типу связи с цианидином, наблюдаются отклонения от этой закономерности. Например, замена рамнозы на глюкозу сопряжена со значительным увеличением R_f во всех системах растворителей. С другой стороны, гликозилирование 3-, 7- и 3'-гидроксильных цианидина приводит к резкому уменьшению подвижности соединений в системах BAW и BuHCl по сравнению с подвижностью дизамещенных производных типа 3-софорозид-5-глюкозида (см. табл. 12.3). Данные, аналогичные приведенным в табл. 12.3, получены и для гликозидов других пяти простых антоцианидинов, содержащихся в растениях.

С антоцианидинами может быть связано и множество других углеводов помимо перечисленных в табл. 12.3. Без особого труда поддаются разделению следующие пары близкородственных гликозидов: 3-галактозид и 3-глюкозид, 3-самбабиозид [ксилозил- $\beta(1 \rightarrow 2)$ -глюкозид] и 3-латириозид [ксилозил- $\beta(1 \rightarrow 2)$ -галактозид], 3-генциобиозид и 3-софорозид. Трудно разделить лишь пигменты, содержащие остатки ацилированных сахаров. Ацилирование гликозидов *n*-кумаровой, кофейной или фелуровой кислотами приводит к уменьшению их подвижности в водных растворителях и к увеличению подвижности в системе BAW. В молекуле антоцианина одна и та же ацильная группа может быть связана одновременно с несколькими углеводными остатками, чем обусловлено весьма сложное строение некоторых растительных пигментов. Например, из растений семейства *Commelinaceae* выделен цианидин-3,7,3'-триглюкозид, ко-

торый, как оказалось, содержит ароматический ацильный заместитель, связанный со всеми тремя остатками глюкозы [25, 26].

12.2.5. Флавонолы и флавоны

Для характеристики этих соединений и их производных широко используется бумажная хроматография, и, по-видимому, нет такой смеси флавонов, которая не была бы с успехом разделена в той или иной системе растворителей из числа приведенных в табл. 12.1. Ниже дано несколько произвольно выбранных примеров, иллюстрирующих возможности этого метода хроматографии.

12.2.5.1. Метилловые эфиры флавонолов

Кверцетин и его изомерные монометилловые эфиры хорошо разделяются в системе BAW. Их подвижность характеризуется следующими значениями R_f : кверцетин 0,64; 3-ОСН₃ 0,93; 5-ОСН₃ 0,48; 7-ОСН₃ 0,72; 3'-ОСН₃ 0,74. 7-Метилловый эфир (рамнетин) и 3'-метилловый эфир (изорамнетин) — два наиболее близких по своей подвижности в системе BAW производных кверцетина — лучше разделяются в системе пропанол — уксусная кислота — вода (1 : 1 : 1). Неожиданно низкое (по сравнению с кверцетином) значение R_f 5-метилового эфира (азалеатина) отчасти обусловлено тем, что в этом соединении исключена возможность образования водородной связи между гидроксильной группой в положении 5 и соседней карбоксильной группой. Некоторые сложности могут возникнуть при разделении при помощи бумажной хроматографии флавонолов метилированных производных. Например, в системе Forestal 7-О-метилмирицетин (европетин) имеет то же значение R_f (0,40), что и кверцетин. Эти соединения, однако, можно разделить в системе BAW (R_f кверцетина и европетина равны соответственно 0,64 и 0,53) или в феноле (R_f кверцетина 0,38, R_f европетина 0,55). Таким образом, разделение флавонолов на бумаге следует проводить, используя несколько различных систем растворителей.

12.2.5.2. Флавоногликозиды

Даже весьма близкие по своей структуре гликозиды разделить при помощи бумажной хроматографии несложно. Например, шесть известных 3-моногликозидов кверцетина в системе BAW имеют следующие значения R_f : рамнозид 0,72; арабинозид 0,70; ксилонзид 0,65; глюкозид 0,58; галактозид 0,55; глюкуроноид 0,40. Рамнозид и арабинозид, имеющие очень близкие значения R_f в этой системе растворителей, обладают совер-

шенно различной подвижностью в воде (R_f равны соответственно 0,19 и 0,07). Изменение положения углеводного остатка в молекуле флавонолгликозида также весьма заметно сказывается на величине R_f . В частности, довольно легко поддаются разделению 3-, 7- и 4'-гликозиды кверцетина, а также 3,4'-, 3,7- и 7,4'-дигликозиды (в системе ВAW значения R_f этих соединений равны соответственно 0,58, 0,37 и 0,48; 0,35; 0,30 и 0,23).

12.2.5.3. С-Гликозилфлавоны

На разработку методов идентификации весьма разнообразных С-гликозидов флавонов растительного происхождения было направлено довольно много усилий [27]. Как выяснилось, наи-

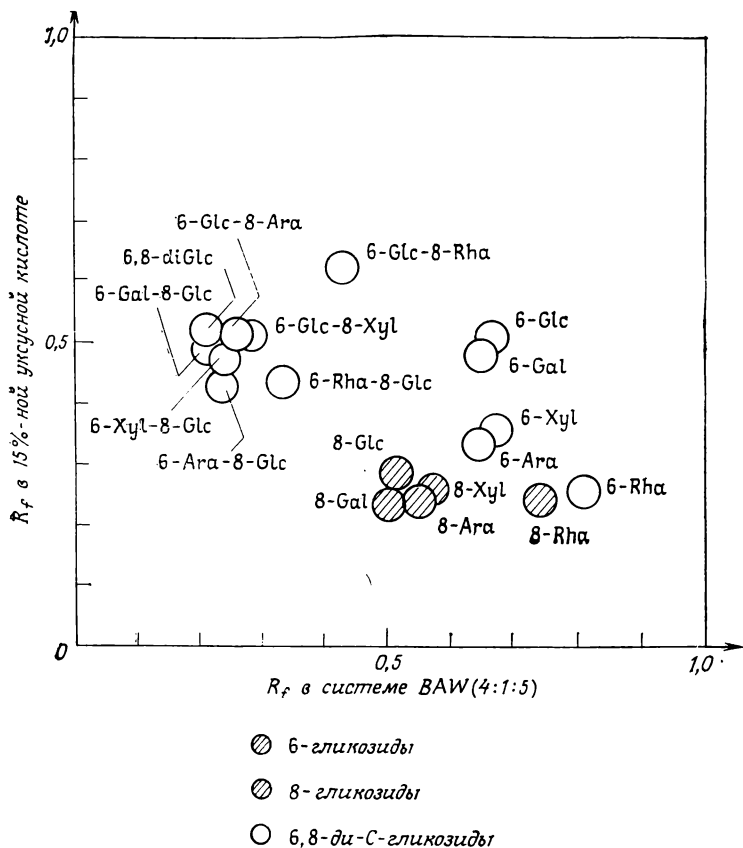


Рис. 12.1. Двумерная хроматография С-гликопиранозилапигенинов на бумаге ватман № 1 [27] (с разрешения авторов).

Glc — β-D-глюкопиранозил, Gal — β-D-галактопиранозил, Xyl — β-D-ксилопиранозил, Ara — α-L-арабинопиранозил, Rha — α-L-рамнопиранозил.

более подходящим методом разделения этих соединений является бумажная хроматография. Отделить С-гликозиды от многих родственных им О-гликозидов можно прежде всего, используя двумерную хроматографию в системе ВAW и в 15%-ной уксусной кислоте: в 15%-ной уксусной кислоте С-гликозиды более подвижны, чем О-гликозиды, и менее подвижны по сравнению с последними в системах, содержащих бутанол. Кроме того, с помощью этого метода можно выделить различные С-гликозиды, в частности 6- и 8-замещенные гликозиды, которые отличаются по своему положению на хроматограмме (рис. 12.1). Хроматографические зоны большинства 6,8-дизамещенных производных апигенина, приведенных на рис. 12.1, до некоторой степени перекрываются; такие соединения можно разделить с помощью ТСХ (см. разд. 12.4).

12.3. Электрофорез на бумаге

Электрофорез на бумаге как метод разделения фенолов не имеет каких-либо существенных преимуществ по сравнению с бумажной хроматографией, но к нему можно прибегнуть в тех случаях, когда анализируемые соединения не удается разделить с помощью других хроматографических методов. Электрофорез на бумаге позволяет установить, присутствует ли в данном феноле диоксibenзольная группировка, и имеет важное значение в анализе бетацианов — единственной группы фенольных соединений, разделение которых предпочтительнее проводить при помощи электрофореза на бумаге, а не бумажной хроматографии.

Основные методики электрофоретического разделения фенолов на бумаге в принципе ничем не отличаются от используемых для разделения других соединений. Чтобы фенольные соединения обладали в электрическом поле подвижностью, они либо должны быть ионизованы, либо должны нести заряд за счет связанных с ними ионов металлов (т. е. обладать способностью образовывать комплексы). При напряженности электрического поля 20—130 В/см разделение длится 15—45 мин. Подвижность обычно выражают относительно некоего эталонного соединения (например, M_{sa} — подвижность относительно салициловой кислоты, M_{nb} — подвижность относительно *n*-оксибензойной кислоты и т. д.). Системы, используемые для электрофореза фенолов, различаются главным образом величиной рН электролита и природой присутствующих в нем ионов металлов, способных образовывать комплексы с разделяемыми соединениями.

В условиях, исключающих образование комплексов, простые

фенолы отделяются от аминокфенолов и от фенолов, содержащих дополнительные функциональные группы. Например, в ацетатном и фосфатном буферах (рН соответственно 5,2 и 7,2) подвижность фенолов (в отличие от аминокфенолов и кислот) равна нулю. Из числа других типов фенольных соединений в этих условиях мигрируют лишь антоцианы и бетацианы. В кислой среде антоцианы несут положительный заряд, однако их разделение отнимает довольно много времени. Так, например, Маркакис [28] установил, что при рН 2 и напряженности электрического поля 7 В/см продолжительность электрофоретического разделения смеси цианидин-3-рутинозида и цианидин-3-софорозида составляет 5 ч. Бетацианы, в молекулах которых содержатся три карбоксильные группы, значительно более подвижны, чем другие фенолы, поэтому для разделения и характеристики этих соединений широко применяют метод электрофореза. В качестве электролитов Линдстедт [29] использовал цитратные буферы (рН 2,7), однако значительно чаще электрофорез проводят в водном растворе муравьиной кислоты (рН 2,4) или в пиридин-формиатном буфере (рН 4,5) при напряженности электрического поля 16 В/см [30, 31].

Щелочные буферные системы употребляются реже, чем кислые, поскольку при высоких значениях рН полифенолы окисляются, что может привести к образованию сильно вытянутых электрофоретических зон. Наиболее часто используют глициновые и боратные буферы, имеющие рН 10. Хотя при таком значении рН простые фенолы достаточно подвижны (например, пирокатехин имеет M_{SA} 0,67), флавонолы обладают низкой подвижностью и разделяются довольно плохо (например, значения M_{SA} кверцетина и мирицетина равны соответственно 0,21 и 0,18), тогда как хроматографическая подвижность этих соединений на бумаге в системе Forestal характеризуется значениями R_f 0,40 и 0,24 соответственно. Для структурного анализа большинства фенолов электрофорез менее пригоден, чем хроматография, поскольку установить связь между структурой соединений и их подвижностью можно только в самой простой буферной системе [6].

С помощью электрофореза в присутствии ионов металлов, способных образовывать комплексы с пирокатехином и его производными, можно отделить эти соединения от родственных им монофенолов. С этой целью использовали щелочные боратные буферы, однако достаточно хорошего разделения можно достичь также в присутствии молибдата натрия при рН 5,2, дополнительное преимущество которого заключается в том, что с диоксибензолами он образует окрашенные в коричневый цвет комплексы [32]. Обнаружению диоксибензолов на электрофореграммах мешают только фенолкарбоновые кислоты, которые

обладают почти такой же подвижностью (например, значения $M_{\text{НВ}}$ пирокатехина и салициловой кислоты равны соответственно 1,15 и 1,18), однако эту трудность можно довольно легко

Таблица 12.4. Электрофоретическая подвижность некоторых флавонов и флавонолсульфатов^а

Соединение	Подвижность	Соединение	Подвижность
8-Оксилетеолин-8-сульфат	0,52	Кверцетин-7-сульфат	0,18
Лютеолин-7-сульфат	0,56	Изорамнетин-7-сульфат	0,25
Апигенин-7-сульфат	0,70	Кемпферол-7-сульфат	0,34
Лютеолин-7-рутинозидсульфат	0,72	Кверцетин-3'-сульфат	0,66
Лютеолин-4'-сульфат	0,75	Кверцетин-3-сульфат	1,00
Апигенин-4'-сульфат	0,80	Изорамнетин-3-сульфат	1,15
Апигенин-7,4'-дисульфат ^б	2,20	Кверцетин-7-сульфат	1,22
Лютеолин-7-сульфат-3'-гликозид	2,50	3-глюкуронид	
Лютеолин-7,3'-дисульфат	3,0	Изорамнетин-7-сульфат-3-глюкуронид	1,28
Лютеолин-7,4'-дисульфат ^б	3,5	Кемпферол-7-сульфат-3-глюкуронид	1,44

^а Электрофорез на бумаге ватман № 3 в формиат-ацетатном буфере (рН 2,2) при напряженности электрического поля 400 В/см; длительность электрофореза 2,5 ч; подвижность относительно кверцетин-3-сульфата.

^б Синтезированные соединения; остальные соединения выделены из природных источников и в большинстве своем также синтезированы.

преодолеть, проведя повторное электрофоретическое разделение в ацетатном буфере (рН 5,2), в котором электрофоретическая подвижность диоксибензолов равна нулю.

Недавно электрофорез на бумаге в формиат-ацетатном буфере (рН 2) был использован для скрининга калиевых солей флавонов и флавонолсульфатов [33—35]. Поскольку эти сульфопроизводные несут суммарный отрицательный заряд, они мигрируют к аноду (табл. 12.4), тогда как все немодифицированные флавоны и флавонолы неподвижны при этом значении рН. Вполне естественно, что дисульфопроизводные мигрируют быстрее моносульфатов, хотя их подвижность и зависит от положения сульфогруппы (ср. лютеолин-7,3'- и лютеолин-7,4'-дисульфаты в табл. 12.4) [35]. Недавно обнаружена еще одна необычная группа флавонов, содержащих остаток малоновой кислоты [36]. При рН 2 эти соединения не обладают электрофоретической подвижностью, а при рН 4 мигрируют к аноду. Аналогичными электрофоретическими свойствами обладают О-глюкурониды флавонов, молекулы которых несут суммарный отрицательный заряд.

12.4. Тонкослойная хроматография

12.4.1. Введение

Тонкослойную хроматографию применяют для разделения фенолов почти всех классов; этот метод весьма универсален, и в большинстве случаев его с успехом можно использовать вместо бумажной хроматографии. Однако, по нашему мнению, его лучше рассматривать как метод, дополняющий бумажную хроматографию. Например, методики разделения на бумаге водорастворимых флавоноидов отработаны столь хорошо, что применять для разделения этих соединений тонкослойную хроматографию, если последняя обладает такой же разрешающей способностью, просто не имеет смысла. Разделение с помощью ТСХ протекает быстрее, но это различие не столь уж велико: например, скорость хроматографии на пластинках с целлюлозой лишь в 4—5 раз больше, чем на бумаге.

Явный недостаток ТСХ заключается в том, что на тонкослойных пластинках флавоноиды обнаруживаются менее легко, чем на бумаге. На бумажной хроматограмме флавоны можно различить по параметрам их флуоресценции, тогда как на силикагеле при УФ-облучении все они обнаруживаются в виде темных пятен. Кроме того, на тонкослойных сорбентах интенсивность флуоресценции антоцианов и производных пирокатехина снижается, а пятна обесцвечиваются значительно скорее, чем на бумаге, поэтому сканировать пластинки необходимо сразу после обнаружения. ТСХ обладает и еще одним недостатком: ни одна система растворителей не позволяет провести разделение фенолов нескольких различных классов на одной и той же пластинке.

Несмотря на перечисленные недостатки, ТСХ является одним из наиболее важных методов разделения фенолов, которому следует отдать предпочтение в тех случаях, когда продолжительность процесса имеет принципиальное значение, когда с помощью бумажной хроматографии трудно добиться разделения анализируемой смеси (например, смеси неполярных флавоноидов) или когда доступно лишь незначительное количество вещества (ТСХ отличается более высокой чувствительностью по сравнению с бумажной хроматографией). С появлением реагента *Naturstoffreagenz A* (β -аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты) проблема обнаружения флавоноидов на полиамидных тонкослойных пластинках отчасти была решена [37]: при взаимодействии флавоноидов с этим реагентом образуются продукты, параметры флуоресценции которых зависят от структуры исходных соединений [38]. Известна также методика обнаружения всех типов фенолов на пластинках с силикагелем,

основанная на использовании реакции азосочетания. Суть этой методики сводится к тому, что в состав сорбента вводят гидрохлорид анилина, а по окончании разделения пластинку опрыскивают водным раствором нитрита натрия; образующийся при этом хлорид фенилдиазония дает с фенолами стабильные окрашенные соединения [39].

12.4.2. Сорбенты и растворители

Несмотря на то что порошкообразный полиамид был в свое время введен в хроматографическую практику специально для разделения флавонов, наиболее популярным сорбентом, несом-

Таблица 12.5. Системы растворителей для ТСХ фенолов

Класс фенолов	Сорбент	Системы растворителей
Простые фенолы и фенолкарбоновые кислоты	Силикагель	Хлороформ—уксусная кислота (9:1), этилацетат—бензол (9:11), этилацетат—легкий петролейный эфир (3:1), диэтиловый эфир—легкий петролейный эфир (1:1)
Кумарины	Силикагель	Бензол—ацетон (9:1), бензол—этилацетат (9:1), хлороформ—этилацетат—муравьиная кислота (2:1:1)
Оксикоричные кислоты	Силикагель	Дихлорметан—толуол—муравьиная кислота (5:4:1), бензол—этилацетат—муравьиная кислота (8:2:1)
Фенилпропены	Силикагель	Бензол—хлороформ (9:1), <i>n</i> -гексан—хлороформ (3:2)
Антоцианидины	Силикагель	Муравьиная кислота—конц. HCl—вода (85:9:6)
Антоцианы	Силикагель	Этилацетат—муравьиная кислота—вода (14:3:3)
Флавоны и флавонолы	Полиамид	Этанол—вода (3:2), метанол—уксусная кислота—вода (19:1:1), бензол—метилэтилкетон—метанол (4:3:3)
Изофлавоны	Силикагель	Метанол—хлороформ (11:89)
Бифлавонылы	Силикагель	Толуол—этилформат—муравьиная кислота (5:4:1)
Ауроны	Силикагель, пропитанный раствором ацетатанатрия	Бензол—этилацетат—муравьиная кислота (9:7:4)
Оксихиноны	Полиамид	Метанол—вода (6:4)
	Силикагель	Легкий петролейный эфир—этилацетат (7:3)
Ксантоны	Силикагель	Бензол—хлороформ (3:7)
Хлорированные фенолы	Силикагель	Легкий петролейный эфир, насыщенный муравьиной кислотой; ксилол, насыщенный формамидом; бензол—уксусная кислота—вода (2:2:1)

Таблица 12.6. ТСХ простых фенолов и фенолкарбоновых кислот [45]

Фенольные соединения	R_f^a				Обнаруживающий реагент	Цвет
	1	2	3	4		
<i>Простые фенолы</i>						
Орцин	19	62	46	67	Ванилин — HCl	Голубовато-розовый
4-Метилрезорцин	25	63	59	65	Ванилин — HCl	Кирпично-красный
2-Метилрезорцин	40	64	58	73	Ванилин — HCl	Голубовато-розовый
Резорцин	17	59	48	74	Ванилин — HCl	Красный
Катехины	35	66	58	72	} Реагент Фолина — Чиокалтеу + NH ₃	Синий
Оксихинон	18	58	34	69		
Пирогаллол	8	15	19	72		
Флороглюцин	5	47	9	62		
<i>Фенолкарбоновые кислоты</i>						
Галловая	5	40	5	40	} Реагент Фолина — Чиокалтеу	Синий
Протокатеховая	19	44	19	52		
Гентизиновая	33	44	41	61	} Реагент Фолина — Чиокалтеу + NH ₃	Синий
<i>n</i> -Оксибензойная	55	80	60	62		
Сиреневая	79	58	74	52		
Ванилиновая	82	73	70	57		
Салициловая	91	82	86	66		

^a Сорбент и система растворителей: 1 — силикагель G, уксусная кислота — хлороформ (1 : 9); 2 — силикагель G, этилацетат — бензол (9 : 11); 3 — целлюлоза MN 300, бензол — метанол — уксусная кислота (45 : 8 : 4); 4 — целлюлоза MN 300, 6%-ная уксусная кислота.

ненно, является силикагель. Порошкообразная целлюлоза, как и следовало ожидать, по своим хроматографическим свойствам очень похожа на фильтровальную бумагу, однако, согласно данным работы [40], этот сорбент обеспечивает лучшее разрешение близкородственных соединений. Смеси целлюлозы с силикагелем, использованные для разделения антоцианов [41] и фенолкарбоновых кислот [42], обладают многими достоинствами обоих сорбентов. На целлюлозе, пропитанной 10%-ным раствором полиамида, было проведено разделение ряда простых алкилированных и галогенированных фенолов [43].

В ТСХ применяют значительно более широкий набор систем растворителей, чем в бумажной хроматографии. В первых экспериментах были опробованы многие из растворителей, используемых в бумажной хроматографии, однако в дальнейшем специально для ТСХ были разработаны другие смеси, содержащие хлороформ, этилацетат и легкий петролейный эфир. Ряд рекомендуемых систем приведен в табл. 12.5. Необходимо от-

метить, что при разделении на силикагеле следует избегать применения водных смесей, предназначенных преимущественно для полиамида.

Значения R_f анализируемых соединений можно найти в одной из монографий, посвященных ТСХ [44]. Приведенные в табл. 12.6 величины R_f некоторых фенолов и фенолкарбоновых кислот иллюстрируют возможности этого метода хроматографии.

12.4.3. Простые фенольные соединения

Тонкослойной хроматографии простых фенолов было уделено очень много внимания в связи с тем, что эти соединения трудно разделить с помощью бумажной хроматографии. Было опробовано большое число хроматографических систем (сорбентом обычно служил силикагель G), однако ни одну из исследованных систем нельзя считать универсальной. Так, например, в системе диэтиловый эфир — легкий петролейный эфир (1:1) можно разделить весьма близкие по своей структуре 2,3-диметилхинол (R_f 0,20) и 2,5-диметилхинол (R_f 0,50), но в то же время нельзя отделить фенол от *n*-крезола (оба соединения имеют R_f 0,44) [46]. Фенол и *n*-крезол можно разделить в виде их 3,5-динитробензоатов в системе бензол — легкий петролейный эфир (1:1) (подвижность этих производных относительно красителя маслянисто-желтого (Butter yellow) характеризуется величинами R_v 0,76 и 1,05 соответственно) [47]. Часто добиться хорошего разрешения смесей феноловых альдегидов и кетонов довольно трудно, поэтому разработана специальная методика разделения этих соединений: их хроматографируют на предварительно обработанных хлорбензолом силикагелевых пластинках в системе бензол — ацетон (24:1), содержащей 0,4% уксусной кислоты [48]. В табл. 12.6 указан состав систем растворителей, используемых для разделения обычных фенолов и фенолкарбоновых кислот растительного происхождения на пластинках с силикагелем и целлюлозой.

Фенолы типа флороглюцина, катехина и протокатеховой кислоты можно обнаружить на пластинках с силикагелем либо по тушению флуоресценции (если слой сорбента содержит флуоресцентный индикатор), либо с помощью одного из реагентов на фенолы (см. табл. 12.2). Опрыскивание хроматограмм предпочтительнее проводить реагентом Фолина — Чиокалтеу, а не раствором хлорида железа и феррицианида. В качестве альтернативного реагента на все типы фенольных соединений предложен раствор кобальтинитрита натрия в разбавленной уксусной кислоте; этот реагент дает окраску от коричневой до желтой и позволяет обнаружить до 2 мкг вещества [49]. С помощью раствора хлорида титана в концентрированной соляной

кислоте можно отличить монофенолы (окрашиваются в желтый цвет) от дифенолов (окрашиваются в коричневый цвет); предел обнаружения составляет 4 мкг [50].

ТСХ является также прекрасным методом разделения оксикоричных кислот и кумаринов. Смесь эфиров *n*-кумаровой кислоты, извлекаемых из сосновой пыльцы, можно разделить с помощью двумерной хроматографии на силикагеле в системах хлороформ—ацетон (2:1) и этилацетат—диметилформамид (50:1) [51]. Систему хлороформ—этилацетат—муравьиная кислота (2:1:1) можно использовать для разделения эфиров кофейной кислоты; эта система позволяет также отделить кофеилглюкозу от оробанхина (эти два соединения обладают одинаковой подвижностью на бумаге во всех опробованных системах растворителей) [45]. Общая методика анализа смесей свободных оксикоричных кислот включает стадию предварительной очистки экстрактов на колонках с полиамидом с последующей ТСХ на силикагеле в нижней фазе системы дихлорметан—вода—уксусная кислота (2:1:1) [52]. Для определения этих соединений применяли также множество других методик, в том числе хроматографию на пластинках с силикагелем, обработанных паром, на пластинках со смесью целлюлозы и силикагеля (1:1) и «многократно исключаящую» ТСХ (т. е. метод удаления примесей с многократно элюируемых хроматограмм) [53].

Описаны также системы ТСХ для кумаринов [54]. Простые оксикумарины, по-видимому, легче всего разделить с помощью бумажной хроматографии, тогда как кумарины сложного строения, особенно такие, которые содержат боковую изопреноидную цепь, являются идеальными объектами для ТСХ. К числу подходящих систем растворителей для ТСХ на силикагеле относятся следующие: хлороформ, диэтиловый эфир—бензол (1:1) и диэтиловый эфир—бензол—10%-ная уксусная кислота (1:1:1).

Оксифенилпропены, обнаруженные в эфирных маслах многих растений, хорошо разделяются в тонких слоях силикагеля при элюировании такими растворителями, как бензол, бензол—хлороформ (9:1) и *n*-гексан—хлороформ (3:2). Обнаруживают их, опрыскивая хроматограммы раствором ванилина в серной кислоте [55] или реагентом Гиббса [56]. Фенилпропенам иногда сопутствуют их аллиловые изомеры, и разделение таких смесей может оказаться довольно трудной задачей. Гавен и Байер [57] предложили проводить разделение одной такой пары соединений эвгенола (R_f 0,25) и изоэвгенола (R_f 0,18) смесью гексан—этилацетат (17:3).

Большинство природных депсидов, найденных в лишайниках, содержат в качестве заместителей остатки фенолов и кар-

боновых кислот. Для разделения соединений этой группы обычно используют ТСХ на силикагеле в системах бензол — диоксан — уксусная кислота (36:9:1), гексан — диэтиловый эфир — муравьиная кислота (13:8:2) или толуол — уксусная кислота (20:3). Стандартизированный метод идентификации депсидов и продуктов их фенольного расщепления, основанный на измерении значений R_f в этих трех системах растворителей, предложен Калберсоном [58], который систематизировал данные для 220 таких соединений. Дополнительную информацию о содержащихся в лишайниках соединениях можно почерпнуть в работах [59, 60].

12.4.4. Флавоноиды

При помощи ТСХ было с большим успехом осуществлено разделение антоцианидинов, однако разрешающая способность ТСХ на силикагеле лишь незначительно выше, чем бумажной хроматографии. Применение обоих хроматографических методов ограничено из-за того, что в целях стабилизации пигментов используемые системы растворителей должны содержать 10—30% муравьиной, уксусной или соляной кислот. Найбом [40] разработал метод двумерной ТСХ на целлюлозе MN 300 в системах муравьиная кислота — конц. HCl — вода (10:1:3) и амиловый спирт — уксусная кислота — вода (2:1:1). Явное преимущество этого метода по сравнению с двумерной бумажной хроматографией заключается в том, что хроматографические зоны, отвечающие пигментам, имеют значительно меньшие размеры. Хорошей системой растворителей для одномерной ТСХ на силикагеле является этилацетат — муравьиная кислота — 2 н. HCl (85:6:9); она позволяет полностью отделить мальвидин от пеонидина (эти два простых антоцианидина чрезвычайно трудно разделить с помощью бумажной хроматографии). Эта система дает хорошие результаты при разделении на силикагеле G обычной квалификации, однако на специально очищенном силикагеле разделение проходит значительно хуже. Это свидетельствует о том, что ионы металлов, присутствующие в неочищенном сорбенте, играют активную роль в процессе хроматографии: они уменьшают подвижность антоцианидинов, содержащих диоксibenзольное ядро, т. е. соединений типа цианидина. Гесс и Майер [61] разделили антоцианы (гликозиды антоцианидинов) на силикагеле; Бёркофер и др. [62] в этих же целях применили смесь полиакрилонитрила и полиамида (7:2), забуференную 0,05 М раствором фосфата калия, а Вролстад [63] использовал тонкослойные пластинки с поливинилпирролидоном, содержащим различные количества целлюлозы. Несмот-

ря на наличие этих методик, антоцианы чаще всего хроматографируют на микрокристаллической целлюлозе в тех же системах растворителей, что и применяемые для бумажной хроматографии.

ТСХ является идеальным методом разделения флавонов и флавонолов, содержащих до трех свободных гидроксильных групп, т. е. моно-, ди- или триоксифлавонов и соответствующих О-метилированных полиоксифлавонов. Для ТСХ на силикагеле наиболее пригодны системы уксусная кислота — хлороформ (1:9) и этилацетат — бензол (9:11), в случае же хроматографии на полиамиде можно использовать систему бензол — легкий петролейный эфир (т. кип. 100—140 °С) — метилэтилкетон — метанол (60:26:7:7) [64, 65]. Флавоноиды, молекулы которых содержат более трех оксигрупп, следует хроматографировать на полиамиде, поскольку силикагель в данной ситуации менее пригоден. В таких случаях хроматография в тонких слоях полиамида дает особенно хорошие результаты, если ее сочетают с бумажной хроматографией: последовательное применение этих методов обеспечивает четкое разделение близкородственных соединений. В табл. 12.7 приведены типичные величины R_f различных метиловых эфиров кверцетина.

Разделение О-гликозидов флавонов и флавонолов целесообразно проводить на микрокристаллической целлюлозе, исполь-

Таблица 12.7. Хроматографическая подвижность метиловых эфиров кверцетина на бумаге и в тонких слоях полиамида [66]^a

Производные кверцетина	hR_f				
	на бумаге			на полиамиде	
	60%-ная AcOH	Forestal	BAW	BMM	BLMM
Кверцетин	33	42	73	20	0
3-Метилловый эфир	63	76	87	40	0
5-Метилловый эфир	40	55	67	20	0
7-Метилловый эфир	55	55	77	45	0
3'-Метилловый эфир	37	53	73	40	0
4'-Метилловый эфир	42	58	79	45	0
3,7-Диметилловый эфир	74	86	90	65	10
7,4'-Диметилловый эфир	60	76	86	65	25
3,7,4'-Триметилловый эфир	82	91	93	80	55
7,3',4'-Триметилловый эфир	64	84	88	85	65
3,7,3',4'-Тетраметилловый эфир	85	93	51	90	80

^a Полиамид квалификации DC 11 (Macherey-Nagel); системы растворителей: BMM — бензол — метилэтилкетон — метанол (4:3:3), BLMM — бензол — легкий петролейный эфир (т. кип. 100—140 °С) — метилэтилкетон — метанол (60:26:7:7), состав других систем см. в табл. 12.1.

зую те же системы растворителей, что и для хроматографии этих соединений на бумаге. Исследована также возможность применения в указанных целях силикагеля и полиамида [67, 68], однако в общем случае эти сорбенты обладают очень низкой разрешающей способностью. В то же время ТСХ на силикагеле является превосходным методом разделения С-гликозидов. Одна из рекомендуемых для этого систем растворителей имеет следующий состав: этилацетат — пиридин — вода — метанол (16:4:2:1). Эта система обеспечивает великолепное разделение очень похожих по структуре С-глюкозил- и С-галактозилапигенинов (табл. 12.8) [27]. Впрочем, такого же разрешения можно достичь и с помощью бумажной хроматографии [69]. Типичные картины разделения гликозилфлавонов, присутствующих в экстрактах некоторых лекарственных растений, представлены на прекрасных цветных иллюстрациях в работе [70].

Таблица 12.8. ТСХ С-гликозилапигенинов на активированном силикагеле G в системе этилацетат — пиридин — вода — метанол (16:4:2:1)

6-Гликозилапигенины	hR_f	8-Гликозилапигенины	hR_f
6-С-Глюкопиранозил-	59	8-С-Глюкопиранозил-	71
6-С-Галактопиранозил-	37	8-С-Галактопиранозил-	59
6-С-Ксилопиранозил-	72	8-С-Ксилопиранозил-	73
6-С-Арабинопиранозил-	61	8-С-Арабинопиранозил-	68
6-С-Рамнопиранозил-	78	8-С-Рамнопиранозил-	72

В настоящее время ТСХ широко применяют для разделения бифлавоноидов и изофлавоноидов. Одна из методик выделения бифлавоноидов из экстрактов растений основана на использовании бумажной хроматографии в системах *n*-бутанол — 2 н. NH_4OH (1:1) и толуол — этилформиат — муравьиная кислота (5:4:1) с последующей ТСХ на силикагеле в системе бензол — пиридин — муравьиная кислота (36:9:5) [45]. В работе [71] суммированы данные о хроматографической подвижности 28 бифлавоноидов на пластинках с силикагелем в 5 системах растворителей. Изофлавоны хроматографировали как на силикагеле, так и на оксиде алюминия; одной из приемлемых систем растворителей для обоих сорбентов является смесь хлороформа, метанола и воды (65:25:4) [72, 73]. Птерокарпаны и изофлавоны обычно разделяют на силикагеле (Merck 60) в системах бензол — этилацетат — метанол — легкий петролейный эфир (т. кип. 60—80°C) (6:4:1:6) или хлороформ — метанол [74].

12.4.5. Оксихиноны

ТСХ с успехом применяется для разделения соединений хиноидной структуры. Большинство природных хинонов является в то же время фенолами, поэтому мы здесь вкратце коснемся разделения соединений этого класса. *n*-Бензохиноны можно разделить во многих хроматографических системах [75, 76], например на ацетилованном полиамиде в водном метаноле или в водном ацетоне. Нафтохиноны хорошо разделяются на силикагеле в системах легкий петролейный эфир (т. кип. 60—80 °С) — этилацетат (например, при соотношении компонентов 7:3) или бензол — легкий петролейный эфир (т. кип. 30—50 °С) (2:1) [77].

Разделение смесей антрахинонов является несколько более сложной процедурой: в зависимости от типа изучаемого пигмента необходимо использовать различные методики. Антрахинонгликозиды можно хроматографировать на пластинках с силикагелем в системе этилацетат — метанол — вода (200:33:27) [78]. Смеси свободных антрахинонов лучше разделяются на пластинках с силикагелем, обработанным раствором винной кислоты, в системе хлороформ — метанол (99:1) или на полиамиде в системе метанол — бензол (4:1) [79]. Чтобы отделить антрахиноны от их восстановленных форм — антронов и диантронов, которые сопутствуют им в экстрактах некоторых растений, лучше всего использовать пластинки со смесью силикагеля и кизельгура (1:6), а в качестве элюента — систему легкий петролейный эфир (т. кип. 40—60 °С) — этилформиат — муравьиная кислота (90:4:1) [80].

Наконец, убикиноны и пластохиноны можно разделить на обработанных парафином пластинках с кизельгуром G в системе ацетон — вода (9:1) [81] или на силикагеле G в системе бензол — легкий петролейный эфир (т. кип. 40—60 °С) (2:3) [82].

12.5. Крупномасштабная колоночная хроматография

12.5.1. Сравнительная характеристика методов

Методики крупномасштабного разделения фенольных соединений принципиально отличаются от рассмотренных выше. Для предварительной очистки фенолов растительного происхождения, для разделения фенолов различных классов, а также для выделения миллиграммовых количеств определенных компонентов смеси в чистом виде часто применяют некоторые типы

колоночной хроматографии. Например, экстракт антоцианов перед анализом с помощью бумажной или тонкослойной хроматографии обычно очищают следующим образом: подкисляют разбавленной соляной кислотой и пропускают через колонку со слабоосновной анионообменной смолой (например, со смолой зеокарб 226), далее колонку промывают водой, а сорбированные пигменты элюируют смесью метанола и уксусной кислоты [83]. Для разделения фенольных соединений используют целый ряд сорбентов: целлюлозу [84], ацетат целлюлозы [85], целит [86], ионообменные смолы [87], магнезол-целит [88], силикагель [89] и полиамид [7]. Значительным достижением в этой области явилось применение колонок с сефадексом, особенно для разделения различных олигомеров и полимеров проантоцианидинов [90].

По причине низкой воспроизводимости результатов колоночная хроматография на целлюлозе и на силикагеле не нашла широкого практического применения. Более того, вместо колонок с целлюлозой или силикагелем можно использовать плотную бумагу ватман № 3 [91, 92] или стеклянные пластинки с толстым (1 мм) слоем силикагеля [44]. Поэтому далее мы рассмотрим лишь методы колоночной хроматографии на полиамиде и сефадексе, которые в настоящее время являются наиболее широко распространенными сорбентами.

12.5.2. Полиамид

Полиамид был впервые предложен в 1957 г. для разделения танинов [93] и с тех пор приобрел широкую популярность в качестве сорбента для хроматографии большинства других групп фенолов. Основные преимущества полиамида по сравнению с другими сорбентами заключаются в том, что он обладает высокой емкостью и что для хроматографии на этом сорбенте пригодны простые по составу системы растворителей (в первую очередь вода, затем водно-спиртовые смеси и, наконец, чистый спирт) [7]. Кроме того, его легко регенерировать, что имеет немаловажное значение, поскольку этот сорбент достаточно дорог. О высокой разрешающей способности полиамида можно судить хотя бы по таким примерам, как эффективное разделение смеси восьми флавонолгликозидов, присутствующих в цветках липы *Tilia argentea*, а также двух близкородственных гликозидов — линарина и пектолинарина, содержащихся в листьях *Cirsium oleraceum*. Колоночная хроматография на полиамиде является простым методом разделения фенолов, принадлежащих к различным классам. С ее помощью, в частности, можно отделить кумарины от флавонов и флавоны от халконов. Например, чтобы на колонке с полиамидом отделить рутин от

эскулина (эти соединения относятся соответственно к флавонам и кумаринам), достаточно промыть ее сначала водой (элюируется рутин), а затем метанолом (элюируется эскулин) [7]. В таких же условиях можно разделить смеси халконов и флаванонов: флаваноны элюируют водой, а халконы — метанолом [94].

12.5.3. Сефадекс

Структура проантоцианидинов (называемых также конденсированными таннинами или лейкоантоцианидинами) была выяснена довольно поздно в связи с тем, что очистка этих соединений была сопряжена со значительными трудностями. Применение хроматографии на сефадексе, несомненно, оказало весьма существенное влияние на развитие исследований в этой области [90, 95]. Этот метод позволил, по существу, впервые добиться удовлетворительного разделения различных олигомеров в соответствии с их молекулярной массой и очистить полимеры для дальнейшего анализа.

Олигомеры таннинов элюируют с сефадекса G-25 50%-ным водным ацетоном. На этом сорбенте разделяются флавоноиды с молекулярной массой от 300 до 900, а соединения с молекулярной массой выше 1100 элюируются в свободном объеме [96]. Методика определения относительной молекулярной массы (M_r) основана на том, что объемы элюирования и величины $\lg M_r$ связаны линейной зависимостью. Для калибровки колонки в этом случае используют катехин (M_r 290) и димер (M_r 578) и тример процианидина (M_r 834). Полимеры проантоцианидина можно очистить на сефадексе G-50 или G-100 в системах вода — спирт [97]. Чтобы выделить чистые полимеры из экстрактов растений, Джонс и др. [98] сначала хроматографировали экстракт на сефадексе G-50, элюируя смесью ацетон — вода (1:1), содержащей 0,1% аскорбата, а затем на колонке с сефадексом LH-20, элюируя 50%-ным водным метанолом; проантоцианидины элюировали смесью ацетон — вода (3:7).

Для разделения низкомолекулярных фенолов в качестве сорбентов предложены сефадексы G-25 и LH-20. Разделение на этих сорбентах происходит не только по механизму молекулярно-ситового распределения, но и по механизму адсорбции. С помощью колоночной хроматографии на сефадексах можно разделить от 5 до 250 мг простых по своему составу смесей фенольных соединений. С сефадекса G-25 фенолы элюируют водой или 0,1 М уксусной кислотой [99], а изофлавоны — 0,1 М NH_4OH [100]. Флавоноиды довольно прочно сорбируются на сефадексе, поэтому их лучше хроматографировать в виде молибдатных комплексов. Смеси обычных флаво- и флавонолглико-

Таблица 12.9. ГЖХ фенолов

Класс фенолов	Производные	Неподвижные фазы	Температура колонки, °С
Антоцианидины	Триметилсилиловые эфиры	3% OV-225 на хромосорбе W HP (100—200 меш)	270
Антрахиноны	Триметилсилиловые эфиры	1,5% SE-30 на хромосорбе W (60—80 меш)	240
Каннабиноиды	—	3% OV-17 на газохроме Q (100—120 меш)	235
Фуранокумарины	—	QF-1	174
Моно- и диоксифлавоны	Триметилсилиловые или метиловые эфиры	2% OV-17 на газохроме Q	250—270
Оксиантоны	Триметилсилиловые или метиловые эфиры	2% силиконовой резины на силанизированном хромосорбе W (80—100 меш)	175
Фенолкарбоновые кислоты	Триметилсилиловые эфиры	3% SE-30 на хромосорбе W AW DMCS (60—80 меш)	
		3% OV-1 или 3% UCW-98 на хромосорбе W HP (100—120 меш)	
Фенолы	Ацетаты	Полифениловый эфир OS-124 Триксиленилфосфат	130—160 150—180
Фенилпропены	—	Сукцинат диэтиленгликоля 20% реоплекса 400 на газохроме Q	150—180 80—200

зидов можно разделить на сефадексе G-25, элюируя сначала водой, а затем 1 М раствором молибдата [99]. Хроматография на сефадексе LH-20 в метаноле позволяет разделить разнообразные флавоны и флавононы, причем в этих условиях флавоны (например, лютеолин) элюируются раньше флавонолов (например, кверцетина), а кверцетин удерживается сильнее его метилированных производных [101].

12.6. Газо-жидкостная хроматография

Для разделения фенольных соединений газовую хроматографию стали широко применять лишь в последние несколько лет. В настоящее время однозначно установлено, что этот метод анализа природных простых фенолов предпочтительнее многих других. Кроме того, в некоторых случаях его можно использовать и для разделения флавоноидов и более сложных фенольных соединений.

Чтобы увеличить летучесть фенолов, их обычно переводят в триметилсилиловые эфиры, но даже и в этом случае разделение необходимо проводить при довольно высокой температу-

ре. В табл. 12.9 приведены некоторые типы неподвижных фаз, носителей и температуры колонок, используемые для разделения фенолов различных классов [102—109].

Чтобы добиться удовлетворительного разрешения произвольных простых фенолов, отличающихся друг от друга положением заместителей, приходится пользоваться несколькими типами колонок, поскольку близкородственные соединения (например, *о*-, *м*- и *п*-крезолы) могут иметь одинаковые времена удерживания на какой-то одной или даже на двух разных колонках. Ирвин и Саксби [102] показали, что для разделения и идентификации 38 фенолов, присутствующих в листьях табака, необходимы три неподвижные фазы (см. табл. 12.9). Дигидро- и моногидрофенолы можно разделить с помощью газовой хроматографии на сорбенте порapak P, содержащем 3% карбовакса 20 M, при 230 °C [110]; относительное время удерживания фенола, пирокатехина, гидрохинона и резорцина в этих условиях равно соответственно 0,33, 1,00, 1,66 и 1,83. Смесь фенолов, содержащихся в коре растений *Salicaceae*, хроматографировали в виде их триметилсилиловых эфиров на колонках, содержащих 3% OV-1, 2% OV-17, 2% OV-25 или 4% OV-25 [111]. Аналогичные методики были применены для фракционирования гликозилированных фенолов, присутствующих в тех же растениях [112, 113].

Одно из основных преимуществ газовой хроматографии по сравнению с другими методами разделения — ее высокая чувствительность. С помощью детектора по захвату электронов можно, например, обнаружить в экстрактах растений несколько микрограммов скополина (это соединение относится к группе кумаринов) [114]. Путем бромирования фенолов и крезолов чувствительность их обнаружения с помощью этого детектора можно увеличить в 100 раз [115]. Одним из примеров того, что в ряде случаев высокая чувствительность имеет принципиальное значение, может служить определение микроколичеств феноловых кислот в свежем почвенном перегное, в котором их содержание составляет около 110 мкг на 1 г сухого вещества. Такого рода анализ был с успехом осуществлен на колонках с хромосорбом W-AW, содержащим 1% силикона OV-1 [116].

Фенолы, содержащие изопреноидные остатки, часто обладают достаточной летучестью, чтобы их можно было непосредственно хроматографировать, не превращая их предварительно в триметилсилиловые эфиры. К числу таких соединений относятся, например, содержащиеся в марихуане каннабиноиды, представляющие собой производные резорцина. Большинство каннабиноидов можно с равным успехом разделить на любой из нижеперечисленных неподвижных фаз: SE-30, QF-1, OV-7, OV-17, карбовакс 20 M, XE-60. Разделение Δ^1 - и Δ^8 -изомеров

тетрагидроканнабинола сопряжено с некоторыми трудностями, однако, в силу того что в анализируемых смесях Δ^1 -тетрагидроканнабинол практически всегда является главным изомером, эти трудности часто легко преодолимы. В частности, эти соединения можно разделить в виде триметилсилиловых эфиров на одной из вышеупомянутых колонок. В свежесрезанных растениях семейства *Cannabis* и в их смоле Δ^1 -тетрагидроканнабинол (соединение, вызывающее галлюцинации) присутствует в виде смеси с родственными кислотами, которые декарбоксилируются в процессе ГЖХ. Применительно к рутинным анализам это явление можно рассматривать как благоприятное, поскольку такая же реакция протекает при курении марихуаны. Чтобы предотвратить декарбоксилирование, каннабиноиды перед анализом силилируют или метилируют [109, 117].

Весьма ограниченное применение ГЖХ для разделения флавонов и флавонолов обусловлено низкой летучестью этих соединений. Однако ГЖХ — превосходный метод разделения высокометилированных флавоноидов и триметилсилиловых эфиров простых моно- и диоксифлавонов [108]. Флавоноиды можно также хроматографировать в виде более летучих замещенных ацетофенонов, образующихся в результате расщепления метилированных флавонов под действием щелочи [118]. С помощью ГЖХ осуществлено разделение даже антоцианидинов, отличающихся очень низкой летучестью [119]; естественно эти соединения были предварительно подвергнуты исчерпывающему силилированию. Сложность идентификации таких производных с помощью масс-спектрометрии обусловлена тем, что в ходе силилирования происходит частичное замещение атома кислорода в гетероцикле на атом азота.

12.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Развитию современной ВЭЖХ как высокочувствительного и быстрого метода разделения и анализа смесей нелетучих органических соединений было положено начало примерно в 1967 г. [120]. Вскоре ВЭЖХ была использована для разделения фенольных соединений, в частности фенолов, присутствующих в экстрактах лишайников [121], однако первые весьма оптимистические прогнозы не оправдались в связи с тем, что исследователям пришлось столкнуться с двумя серьезными проблемами. Во-первых, большинство из доступных в то время сорбентов, которыми можно было набивать колонки для ВЭЖХ, оказалось непригодным для разделения многих фенольных соединений, отличающихся высокой полярностью, и, во-вторых, даже

при разделении неполярных производных фенолов (например, метилированных флавонов, присутствующих в экстрактах цитрусовых) необходима тщательная предварительная очистка экстрактов растений перед их нанесением на колонку.

Первая проблема была в основном решена после того, как в 1976 г. Вульф и Нагель [122] ввели в практику исследований метод обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для разделения флавоноидов и феноловых кислот эти авторы использовали силикагель с привитыми октадецилсилильными остатками (μ -бондапак C_{18}), а в качестве элюента — смесь воды, метанола и уксусной кислоты (13:6:1). Вторая проблема осталась нерешенной: за исключением некоторых благоприятных ситуаций, ВЭЖХ все еще нельзя использовать для обнаружения тех или иных групп производных фенолов непосредственно в экстрактах растений. Перед разделением при помощи указанного метода экстракты обычно подвергают определенной обработке. Часто целесообразно также провести предварительное фракционирование смеси с помощью какого-либо другого хроматографического метода (например, с помощью колоночной или тонкослойной хроматографии на полиамиде).

В силу вышеупомянутого ограничения применение ВЭЖХ наиболее успешно в тех случаях, когда не возникает необходимости в тщательной предварительной очистке проб. Например, кристаллические отложения флавоноидов на нижней поверхности листьев некоторых видов папоротников практически не содержат примесей. В данном случае берут небольшой, площадью около 1 см^2 , сегмент пигментсодержащей пиннулы, растворяют его в тетрагидрофуране и полученный раствор непосредственно наносят на колонку с обращенной фазой ультрасфер-ODS (Altex, Berkeley, CA, США). Далее флавоноиды хроматографируют в системе 10%-ная уксусная кислота — тетрагидрофуран (2:1) [123]. Присутствующие в анализируемой смеси различные метиловые эфиры кемпферола, халконы и флаваноны обнаруживают по поглощению элюата при 367 нм (рис. 12.2). Таким образом можно очень быстро установить, различаются ли по своему составу смеси флавоноидов, полученных из растений, принадлежащих к одному виду (в данном случае из папоротников *Pityrogramma triangularis*), и если различаются, то в чем состоит это различие. Кроме того, разрешающая способность этого метода выше, чем у ТСХ, и он позволяет с большей достоверностью оценить содержание отдельных компонентов [123].

Другим примером успешного применения ВЭЖХ для разделения флавоноидов может служить исследование интенсивно окрашенных экстрактов чашелистиков *Poinsettia*, проведенное с целью выявить связь между относительным содержанием пя-

ти присутствующих в этих экстрактах антоцианов и принадлежностью данного растения к тому или иному сорту. Указанные экстракты были с успехом разделены на колонках с μ -бондапаком C_{18} [124] и лихросорбом RP-18 [125] соответственно в режиме изократического и градиентного элюирования. Анало-

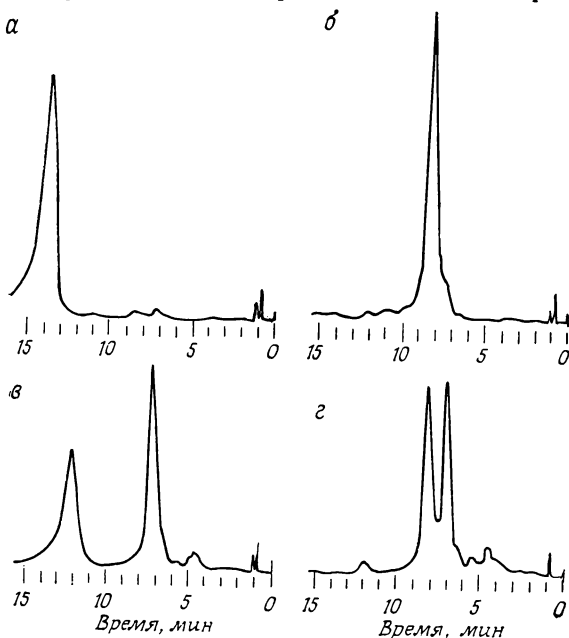


Рис. 12.2. Высокоскоростная жидкостная хроматография флавоноидов из трех хемотипов папоротника *Pityrogramma triangularis* [123] (с разрешения авторов).

а — хемотип 7-метилового эфира галангина; б — хемотип галангина; в — хемотип 4'-метилового и 7,4'-диметилового эфиров кемпферола; г — гибрид хемотипов б и в.

гичным образом был проведен анализ смесей от восьми до десяти флавонолгликозидов, присутствующих наряду с антоцианами в этих же растениях. Разделение флавонолгликозидов проводилось на колонке $300 \times 3,9$ мм с μ -бондапаком C_{18} при градиентном элюировании смесью 2%-ная уксусная кислота — ацетонитрил или 2%-ная уксусная кислота — тетрагидрофуран [126].

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что в принципе для хроматографического анализа пригодны и неочищенные экстракты цветочных лепестков, поскольку содержание флавоноидов в цветах обычно очень велико, тогда как количество примесей, необратимо сорбирующихся на колонке, по-видимому, мало. В то же время экстракты листьев практически

Таблица 12.10. Сорбенты и системы растворителей для ВЭЖХ фенольных соединений

Класс фенолов	Сорбенты	Элюенты	Литература
Ацилфлороглюцины	μ-Бондапак C ₁₈ ^a	Тетрагидрофуран — фосфорная кислота — вода (650 : 1 : 350)	128
Антоцианидины	μ-Бондапак C ₁₈ ^a	Вода — уксусная кислота — метанол (71 : 10 : 19)	129
Антоцианы	Лихросорб RP-18 ^a	1,5%-ная фосфорная кислота, 20%-ная уксусная кислота и 25%-ный раствор ацетонитрила в воде	125
Антрахиноны	Микропак CN-5	Метанол — вода (1 : 1), подкисленная до pH 3	130
Бензо- и нафтохиноны	Микропак Si-10	1%-ный раствор пропанола-2 в легком петролейном эфире	130
Бифлавоноиды	Меркосорб S-160	8%-ный раствор метанола в диизопропиловом эфире	131
Флавоны и флавонолы	μ-Бондапак алкилфенил	Этанол — вода — уксусная кислота (650 : 1 : 350)	132
Флавонолгликозиды	μ-Бондапак C ₁₈ ^a	2%-ная уксусная кислота и тетрагидрофуран (градиент)	126
Фуранокумарины	Корасил I (37—50 мкм)	Смеси хлороформа с циклогексаном	133
Гликозилфлавоны ^b	Лихросорб NH ₂ ^a	Смеси ацетонитрила с водой	134
Эфиры оксикоричной кислоты	ЕСТЕОЛА-целлюлоза	Дихлорметан — уксусная кислота (99 : 1) и пропанол-1	135
Изофлавоноиды	Порасил	3 ч. смеси дихлорметан — этанол — уксусная кислота (485 : 15 : 1) и 22 ч. гексана	136
Метилированные флавоны	Лихросорб Si-60	Гептан — этанол (3 : 1)	137
Фенолкарбоновые кислоты	μ-Бондапак C ₁₈ ^a	Вода — метанол — уксусная кислота (12 : 6 : 1)	122
Феноловые альдегиды	Сферисорб C ₁₈ ^a	Вода — уксусная кислота — <i>n</i> -бутанол (342 : 1 : 14)	138
Проантоцианидины	Лихросорб RP-8	Смеси воды с метанолом	139
Ксантоны	Микропак CN	<i>n</i> -Гексан — хлороформ (13 : 7)	140

^a Обращенная фаза.^b Для разделения этих соединений было также использовано множество других систем растворителей (см. работу [5]).

всегда необходимо предварительно тщательно очищать. Избегать предварительной очистки экстракта можно следующим образом: содержащиеся в неочищенном экстракте флавоны ацетилируют (экстракт предварительно упаривают досуха) и отделяют кристаллическую смесь ацетатов. Далее эту смесь можно разделить на колонке с силикагелем в системе бензол —

ацетон (18:3) или изооктан — этанол — ацетонитрил (140:32:11) [127].

Достаточно мягкие условия ВЭЖХ позволяют работать с весьма лабильными соединениями, не опасаясь потерь вещества в ходе анализа. Среди множества классов природных фенольных соединений известно несколько таких, представители которых неустойчивы, особенно в присутствии даже микроколичеств щелочи. К таким соединениям относятся, например, ацилфлороглюцины, содержащиеся в различных видах *Dryopteris*. Естественно предположить, что наиболее подходящим методом их разделения могла бы стать ВЭЖХ. Действительно, удовлетворительные результаты были получены при хроматографировании ацилфлороглюцинов на колонке с обращенной фазой μ -бондапак C_{18} в системе тетрагидрофуран — фосфорная кислота — вода (650:1:350) [128].

Практически для каждого класса природных фенолов подобраны подходящие колонки и системы растворителей. В табл. 12.10 кратко описаны несколько соответствующих методик, а дополнительные библиографические сведения можно почерпнуть в обзоре [5]. ВЭЖХ (табл. 12.10) уже получила признание, и ее следует включить в набор хроматографических методов разделения фенольных соединений. Наиболее существенное преимущество ВЭЖХ по сравнению с другими широко распространенными методами хроматографии заключается, по-видимому, в том, что она позволяет получать точные количественные данные. Применительно к флавоноидам эта задача прежде представляла определенные трудности, однако появившаяся в настоящее время возможность количественного определения флавоноидов в различных тканях, несомненно, стимулирует дальнейшее развитие метода ВЭЖХ, направленное на преодоление существующих недостатков. Это приведет к значительно более широкому применению этого мощного аналитического метода в области исследования фенольных соединений.

12.8. Заключение

Наиболее многообещающим методом анализа фенолов является пока ВЭЖХ, однако не исключено, что какой-либо из других постоянно развивающихся методов хроматографии в конце концов приобретет не менее важное значение в этой области исследований. Обращенно-фазовая высокоэффективная ТСХ на силикагеле недавно была использована для разделения ряда фенолкарбоновых кислот и простых флавоноидов. Полученная картина разделения принципиально отличается от характерной для обычной ТСХ, хотя селективность этого метода и не столь высока, как у ТСХ на обычных сорбентах [132].

В качестве эффективного и быстрого метода разделения гликозидов флавоноидов на препаративном уровне (от нескольких миллиграммов до нескольких граммов) предложена капельная противоточная хроматография [141]. Например, из суммарной фракции гликозидов флавоноидов растений семейства *Tesotastans*, содержащей 130 мг вещества, с помощью этого метода можно выделить 27 мг чистого изокверцетина. В этом случае верхней фазой служит смесь хлороформа, метанола и воды (7:13:8), а вся процедура занимает примерно 6 ч.

В связи с высокими ценами на органические растворители при выборе хроматографической системы для разделения фенолов необходимо принимать во внимание соотношение между стоимостью и эффективностью той или иной процедуры. Обращаясь к какому-либо новому методу разделения, нецелесообразно отказываться от уже существующих как от безусловно худших, особенно если они дешевле. Лигнаны, давно известные как соединения растительного происхождения, совсем недавно обнаружены и в тканях животных [142, 143]. Здесь следует отметить, что, хотя эти соединения можно разделить с помощью ВЭЖХ [144], авторы работ [142, 143] отдают предпочтение методу ГЖХ (лигнаны хроматографируют в виде триметилсилиловых эфиров на колонке с OV-1 на газохроме Q). Вероятно, такой выбор обусловлен возможностью применения ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией — надежным и чувствительным методом обнаружения анализируемых соединений. Кроме того, для очистки экстрактов авторы указанных работ использовали хроматографию на сефадексе LH-20 и в тонких слоях. Исходя из этого, можно заключить, что, поскольку в тканях живых организмов могут встречаться различные фенольные соединения, нельзя ориентироваться на какой-либо один метод разделения таких сложных смесей. По меньшей мере в обозримом будущем для решения конкретных проблем в данной области исследований придется использовать ряд различных методов хроматографии.

Литература

1. Karrer P., Strong F. M. *Helv. Chim. Acta*, **19**, 25 (1936).
2. Bale-Smith E. C. *Nature (London)*, **161**, 835 (1948).
3. Norman R. O. C., Smith J. R. L., Radda G. K. — In: *Methods in Polyphenol Chemistry*./Ed. Pridham J. B. Oxford, Pergamon, 1964, p. 125.
4. Preston S. T., Jr. *Guide to the Analysis of Phenols by Gas Chromatography*. IL, Evanston: Polyscience, 1966.
5. Van Sumere C. F., Van Brussel W., Vande Castele K., Van Rompaey L. — In: *Biochemistry of Plant Phenolics*./Eds. Swain T., Harborne J. B., Van Sumere C. F. New York: Plenum, 1979, p. 1.
6. Pridham J. B. — In: *Methods in Polyphenol Chemistry*./Ed. Pridham J. B. Oxford: Pergamon, 1964, p. 111.

7. *Hörhammer L.* — In: *Methods of Polyphenol Chemistry*./Ed. Pridham. Oxford, Pergamon, 1964, p. 89.
8. *Woof J. B., Pierce J. S.* *J. Chromatogr.*, **28**, 94 (1967).
9. *Harborne J. B.* — In: *Encyclopedia of Plant Physiology*./Eds. Bell E. A., Charlwood B. V. New Series, Vol. 8. Berlin, Springer, 1980, p. 329.
10. *Harborne J. B., Mabry T. J., Marby H.* (Editors). *The Flavonoids*./Eds. Mabry T. J., Mabry H. London: Chapman and Hall, 1975.
11. *Thomson R. H.* *Naturally Occurring Quinones*. London: Academic Press, 1971.
12. *Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B.* *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Springer, 1970.
13. *Ibrahim R. K., Towers G. H. N.* *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 125 (1960).
14. *Wong E., Taylor A. O.* *J. Chromatogr.*, **9**, 449 (1962).
15. *Sundt E. J.* *Chromatogr.*, **6**, 475 (1961).
16. *Colombo P., Corbetta B., Pirotta A., Ruffini G. J.* *Chromatogr.*, **6**, 467 (1961).
17. *Crump G. B.* *J. Chromatogr.*, **10**, 21 (1963).
18. *Jiraček V., Procházka Z.* — In: *Paper Chromatography*./Eds. Hais I. M., Macek K. New York: Academic Press, 1963, p. 254.
19. *Harborne J. B.* *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, London: Academic Press, 1967.
20. *Harborne J. B.* *J. Chromatogr.*, **2**, 581 (1959).
21. *Lederer E., Lederer M.* *Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1957.
22. *Bloch R. J., Durrum E. L., Zweig G. A.* *Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. New York: Academic Press, 1958.
23. *Reio L. J.* *Chromatogr.*, **4**, 458 (1960).
24. *Hansel R.* — In: *Paper-chromatographie in der Botanik*. 2nd Edn. Berlin: Springer, 1959, p. 228.
25. *Yoshitama K.* *Bot. Mag.*, **91**, 207 (1978).
26. *Stirton J. Z., Harborne J. B.* *Biochem. Syst. Ecol.*, **8**, 285 (1980).
27. *Chopin J., Bouillant M. L.* — In: *The Flavonoids*./Eds. Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. London: Chapman and Hall, 1975, p. 632.
28. *Markakis P.* *Nature (London)*, **187**, 1092 (1960).
29. *Lindstedt G.* *Acta Chem. Scand.*, **10**, 698 (1956).
30. *Dreiding A. S.* *Helv. Chim. Acta*, **45**, 640 (1962).
31. *Piatelli M., Minale L.* *Phytochemistry*, **3**, 547 (1964).
32. *Pridham J. B.* *J. Chromatogr.*, **2**, 605 (1959).
33. *Harborne J. B., Williams C. A.* *Z. Naturforsch.*, **26b**, 490 (1971).
34. *Williams C. A., Harborne J. B., Clifford H. T.* *Phytochemistry*, **12**, 2417 (1973).
35. *Harborne J. B.* *Progr. Phytochem.*, **4**, 189 (1978).
36. *Kreuzaler F., Hahlbrock K. H.* *Phytochemistry*, **12**, 1149 (1973).
37. *Neu R.* *Naturwissenschaften*, **44**, 181 (1957).
38. *Homberg H., Geiger H.* *Phytochemistry*, **19**, 2443 (1980).
39. *Chhabra B. R., Gulati R. S., Dhillon R. S., Kalsi P. S.* *J. Chromatogr.*, **135**, 521 (1977).
40. *Nybom N.* *Physiol. Plant.*, **17**, 157 (1964).
41. *Asen S. J.* *Chromatogr.*, **18**, 602 (1965).
42. *Van Sumere C. F., Wolf G., Tenchy H., Kint J. J.* *Chromatogr.*, **20**, 48 (1965).
43. *Bark L. S., Graham R. J. T.* *J. Chromatogr.*, **27**, 131 (1967).
44. *Stahl E.* *Thin Layer Chromatography*. English Edn. London: Allen and Unwin, 1965.
45. *Harborne J. B.* *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall, 1973.
46. *McHale D.* *Thin-Layer Chromatography*. London: United Trade Press, 1964, p. 47.
47. *Dhont J. H., de Rhooy C.* *Analyst (London)*, **86**, 527 (1961).

48. Chawla H. M., Gambhier I., Kathuria L. J. *Chromatogr.*, **188**, 289 (1980).
49. Bhatia I. S., Bajaj K. L., Verma A. K., Singh J. J. *Chromatogr.*, **62**, 471 (1971).
50. Eskin N. A. M., Frenkel C. J. *Chromatogr.*, **150**, 293 (1978).
51. Strohl M. J., Seikel M. K. *Phytochemistry*, **4**, 383 (1964).
52. Schulz J. M., Herrmann K. J. *Chromatogr.*, **195**, 95 (1980).
53. Van Sumere C. F., Rev. Ferment Ind. Aliment., **24**, 91 (1969).
54. Abdul Ahy F. M., Abu-Mustafa E. A., El-Tawil B. A. H., Fayez M. B. E. *Planta Med.*, **13**, 91 (1965).
55. Harborne J. B., Heywood V. H., Williams C. A. *Phytochemistry*, **8**, 2223 (1969).
56. Forrest J. K., Richard R., Heacock R. A. J. *Chromatogr.*, **65**, 439 (1972).
57. Guven K. C., Bayer P. *Eczacilik Bul.*, **12**, 185 (1970).
58. Culberson C. F. J. *Chromatogr.*, **72**, 113 (1972).
59. Culberson C. F. J. *Chromatogr.*, **97**, 107 (1974).
60. Culberson C. F., Johnson A. J. *Chromatogr.*, **128**, 253 (1976).
61. Hess D., Meyer C. Z. *Naturworsch.*, **17b**, 853 (1962).
62. Birkofer L., Kaiser C., Stoll H. A. M., Suppan F. Z. *Naturforsch.*, **17b**, 352 (1962).
63. Wrolstad R. E. J. *Chromatogr.*, **37**, 542 (1968).
64. Harborne J. B. *Phytochemistry*, **7**, 1215 (1968).
65. Wollenweber F., Egger K. *Phytochemistry*, **10**, 225 (1971).
66. Jay M., Gonnett J. F., Wollenweber E., Voirin B. *Phytochemistry*, **14**, 1605 (1975).
67. Chia Y. F. Yao Hsuek Hsuek Pao., **11**, 485 (1964).
68. Davidek J., Prochaska Z. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2947 (1961).
69. Castledine R. M., Harborne J. B. *Phytochemistry*, **15**, 803 (1976).
70. Forni G. P. *Fitoterapia*, **51**, 13 (1980).
71. Chexal K. K., Handa B. K., Rahman W. J. *Chromatogr.*, **48**, 484 (1970).
72. Wang L. C. *Anal. Biochem.*, **42**, 296 (1971).
73. Sachse J. J. *Chromatogr.*, **58**, 297, (1971).
74. Ingham J. L., Dewick P. M. *Phytochemistry*, **19**, 1767 (1980).
75. Barbier M. J. *Chromatogr.*, **2**, 649 (1958).
76. Petterson G. J. *Chromatogr.*, **12**, 352 (1963).
77. Zenk M. H., Fürbringer M., Steglich W. *Phytochemistry*, **8**, 2199 (1969).
78. Hörhammer L., Wagner H. *Deut. Apoth.-Ztg.*, **105**, 827 (1965).
79. Fairbairn J. W., El-Muhtadi K. *Phytochemistry*, **11**, 263 (1972).
80. Labadie R. P. *Pharm. Weekbl.*, **104**, 257 (1969).
81. Wagner H., Hörhammer L., Dengler B. J. *Chromatogr.*, **7**, 211 (1962).
82. Whistance G. R., Threlfall D. R. *Phytochemistry*, **9**, 737 (1970).
83. Jarman S. J., Crowden B. K. *Phytochemistry*, **12**, 171 (1973).
84. Chandler B. V., Harper K. A. *Nature (London)*, **181**, 131 (1958).
85. Roberts E. A. H., Myers M. J. *Sci. Food Agr.*, **10**, 176 (1959).
86. Pope G. S., Elcoate P. V., Simpson S. A., Andrews D. G. *Chem. Ind. (London)*, 1092 (1953).
87. Hori M. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **42**, 2333 (1969).
88. Ice C. H., Wender S. H. *Anal. Chem.*, **24**, 1616 (1952).
89. Li K. C., Wagenknecht A. C. J. *Amer. Chem. Soc.*, **78**, 979 (1956).
90. Somers T. C. *Nature (London)*, **209**, 368 (1966).
91. Koeppen B. H., Smit C. J. B., Roux D. G. *Biochem. J.*, **83**, 507 (1962).
92. Seikel M. K., Chow J. H. S., Feldman L. *Phytochemistry*, **5**, 439 (1966).
93. Grassmann W., Endres H., Pauckner W., Mathes H. *Chem. Ber.*, **90**, 1125 (1957).
94. Neu R. *Arch. Pharm.*, **293**, 169 (1959).
95. Somers T. C. J. *Sci. Food Agr.*, **18**, 193 (1967).
96. Porter L. J., Wilson R. D. J. *Chromatogr.*, **71**, 570 (1972).

97. Somers T. C. *Phytochemistry*, **10**, 2175 (1971).
98. Jones W. T., *et al.* *Phytochemistry*, **15**, 1407 (1976).
99. Woof J. B., Pierce J. C. *J. Chromatogr.*, **28**, 94 (1967).
100. Porath J. *Nature (London)*, **218**, 2044 (1968).
101. Johnston K. M., Stern D. J., Weiss A. C. *J. Chromatogr.*, **33**, 539 (1968).
102. Irvine W. J., Saxby M. J. *Phytochemistry*, **8**, 2067 (1969).
103. Blakley E. R. *Anal. Biochem.*, **15**, 350 (1966).
104. Morita H. *J. Chromatogr.*, **71**, 149 (1972).
105. Wagner H., Hölzl J. *Deut. Apoth.-Ztg.*, **42**, 1620 (1968).
106. Reyes R. E., Gonzalez A. G. *Phytochemistry*, **9**, 833 (1970).
107. Jefferson A., Stacey C. I., Scheinmann F. J. *J. Chromatogr.*, **57**, 247 (1971).
108. Nordstrom C. G., Kroneld T. *Acta Chem. Scand.*, **26**, 2237 (1972).
109. Mechoulam R. *Science*, **168**, 1159 (1970).
110. Kusy V. *J. Chromatogr.*, **57**, 132 (1971).
111. Steele J. W., Bolan M. *J. Chromatogr.*, **71**, 427 (1972).
112. Bolan M., Steele J. W. *J. Chromatogr.*, **36**, 22 (1968).
113. Steele J. W., Bolan M., Audette R. C. S. *J. Chromatogr.*, **40**, 370 (1969).
114. Andersen R. A., Vaughn T. H. *Phytochemistry*, **11**, 2593 (1972).
115. Hoshika Y., Muto G. *J. Chromatogr.*, **179**, 105 (1979).
116. Matsumoto G., Hanya T. *J. Chromatogr.*, **193**, 89 (1980).
117. Willinsky M. D. — In: *Marijuana Chemistry, Metabolism, Pharmacology and Clinical Aspects.*/Ed. Mechoulam. New York: Academic Press, 1973, p. 137.
118. Bekassy S., Nogradi M. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **59**, 423 (1969).
119. Bombardelli E., Bonati A., Gabetta B., Martinelli E. M., Mustich G. *J. Chromatogr.*, **139**, 111 (1977).
120. Giddings J. C. — In: *Chromatography.*/Ed. Heftmann E. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 27.
121. Culberson C. F. *Bryologist*, **75**, 54 (1972).
122. Wulf L. W., Nagel C. W. *J. Chromatogr.*, **116**, 271 (1976).
123. Smith D. M. *Bull. Torrey Botan. Club.*, **107**, 134 (1980).
124. Stewart R. N., Asen S., *et al.* *Biochem. Syst., Ecol.*, **7**, 281 (1979).
125. Strack D., Akavia N., Reznik H. *Z. Naturforsch.*, **35c**, 533 (1980).
126. Stewart R. N., Asen S., Massie D. R., Norris K. H. *Biochem. Syst. Ecol.*, **8**, 119 (1980).
127. Galensa R., Herrmann K. *J. Chromatogr.*, **189**, 217 (1980).
128. Widen C. J., Pyysalo H., Salovaara P. *J. Chromatogr.*, **188**, 213 (1980).
129. Wilkinson M., *et al.* *J. Chromatogr.*, **132**, 349 (1977).
130. Rittich B., Krska M. *J. Chromatogr.*, **130**, 189 (1977).
131. Ward R. S., Pelter A. *J. Chromatogr.*, **12**, 570 (1974).
132. Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastré R. *J. Chromatogr.*, **187**, 255 (1980).
133. Stermitz F. B., Thomas R. D. *J. Chromatogr.*, **77**, 431 (1973).
134. Becker H., Wilking G., Hostettmann K. *J. Chromatogr.*, **136**, 174 (1977).
135. Nagels L., Van Dongen W., De Brucker J., De Pooter H. *J. Chromatogr.*, **187**, 181 (1980).
136. Carlson R. E., Dolphin D. *J. Chromatogr.*, **198**, 193 (1980).
137. Bianchini J. P., Gaydon E. M. *J. Chromatogr.*, **190**, 233 (1980).
138. Hartley R. D., Buchan H. *J. Chromatogr.*, **180**, 139 (1979).
139. Lea A. G. H. *J. Chromatogr.*, **194**, 62 (1980).
140. Hostettmann K., Jacot-Guillarmod A. *J. Chromatogr.*, **124**, 381 (1976).
141. Hostettmann K., Hostettman-Kaldas M., Nakanishi K. *J. Chromatogr.*, **170**, 355 (1979).
142. Stitch S. R., Tumba J. K., Groen M. B., Funke C. W., Leemhuis J., Vink J., Woods G. F. *Nature (London)*, **287**, 738 (1980).
143. Setchell K. D. R., Lawson A. M., Mitchell F. L., Adlercreutz H., Kirk D. N., Axelsson M. *Nature (London)*, **287**, 740 (1980).
144. Andersson R., *et al.* *Acta Chem. Scand.*, **29B**, 835 (1975).

Глава 13

Пестициды

Лоуренс Фишбейн

13.1. Введение

Автор данной главы поставил перед собой две следующие задачи: во-первых, осветить последние наиболее крупные достижения ВЭЖХ, ГЖХ, хроматомасс-спектрометрии и ТСХ в области анализа отдельных наиболее важных классов пестицидов и, во-вторых, рассмотреть определение микроколичеств таких соединений, как хлорированные дибензодиоксины, нитрозированные пестициды и нитрозамины, являющихся опасными тканях и в окружающей среде [1].

13.2. Газовая хроматография

Благодаря превосходной разрешающей способности, достаточно высокой чувствительности и универсальности методы газовой хроматографии широко применяются для разделения пестицидов и определения их микроколичеств в биологических тканях и в окружающей среде [1].

13.2.1. Карбаматы

Методы газовой хроматографии повсеместно используются для определения карбаматов, которые находят широкое применение в качестве инсектицидов, фунгицидов, гербицидов, нематодцидов, инсектоакарицидов и средств борьбы с моллюсками [2, 3]. Однако принято считать, что целый ряд методов определения карбаматов с помощью газовой хроматографии сопряжен с определенными трудностями. Хотя преимущества прямых методов газовой хроматографии в анализе исходных карбаматов очевидны, большинство N-метильных производных этих соединений либо слишком сильно удерживаются на колонке, либо разлагаются до соответствующих фенолов [4—8]. Обычно разделение проходит более успешно, если применять стеклянные колонки, метильные или фенильные силиконовые неподвижные фазы с низкой полярностью, специальные методы подготовки колонок к работе и если проводить разделение при

умеренной температуре [9—11]. Пределы обнаружения немодифицированных карбаматов при помощи ГЖХ с использованием специально обработанных неподвижных фаз [4, 5, 12] обычно превосходят 10 нг [4, 5]. Анализ карбаматов на уровне пикограммов можно провести после их предварительного превращения в термостабильные производные [2, 4, 13—21]. Так, например, путем обработки карбаматов ангидридами различных перфторкарбоновых кислот были получены соответствующие N-перфторацильные производные [16]. Реакцию катализировали различным образом, например путем нагревания [16], добавления пиридина [19, 20] или триметиламина [21]. В последнем случае длительность реакции составляет всего 30 мин. При помощи детектора Коулсона можно определить 14 из 16 перфторацилпроизводных карбаматов [21].

Вместе с тем методы получения производных ароматических карбаматов, включающие гидролиз исходных соединений до соответствующих фенолов или аминов и взаимодействие последних с реагентами, обогащенными атомами галогенов, часто имеют некоторые недостатки, наличие которых может привести к сужению области применения данного метода обнаружения карбаматов и к уменьшению его чувствительности. К таким недостаткам относятся: присутствие побочных продуктов реакций, недостоверность идентификации производных в случае некоторых методик анализа и ограниченное число пестицидов, анализ которых можно выполнить при помощи какого-то одного конкретного метода [4, 5, 22]. Златкис и Пооле [23] опубликовали превосходный обзор общих методов получения производных, пригодных для ГЖХ-анализа с использованием детектора электронного захвата (ДЭЗ).

Признано, что анализ тканей животных на присутствие в них инсектицидов, являющихся производными карбаминовой кислоты, представляет собой более трудную задачу, чем анализ образцов растительного происхождения, почвы и воды, поскольку, как полагают, в тканях происходит ферментативный гидролиз исходных соединений [22]. Маунт и Оэме [24] описали метод определения микроколичеств карбарила (1-нафтилметилкарбамата) в крови и в тканях животных, отравленных этим инсектицидом. Для приготовления образцов ткани экстрагировали дихлорметаном и ацетоном в шаровой мельнице, липиды удаляли вымораживанием и при помощи микроколоночной хроматографии на флорисиле в системе этилацетат — гексан (1:4). Карбарил ацилировали гептафтормасляным ангидридом в присутствии триметиламина, полученную смесь хроматографировали на колонке, содержащей 3% OV-17, для определения гептафторбутирильного производного использовали ДЭЗ. Предел обнаружения карбарила составлял: $2 \cdot 10^{-6}\%$ в образцах

крови и $10^{-5}\%$ в образцах тканей. Этот метод позволяет проводить подготовку одновременно нескольких образцов и обеспечивает высокую чувствительность определения карбарила в крови и в тканях животных.

Чтобы определить содержание пропоксура (2-изопропокси-фенил-N-метилкарбамата) и его метаболита — 2-изопропокси-фенола — в крови, моче и в тканях, соответствующим образом подготовленные образцы предварительно фракционировали на тонкослойных пластинках, а затем анализировали на газовом хроматографе (неподвижная фаза — 10% DC-200), снабженном ДЭЗ [25], в соответствии с методом Коэна и др. [26]. Холл и Харрис [5] исследовали возможности газовой хроматографии

Таблица 13.1. Относительные времена удерживания пестицидов — производных карбаминовой кислоты при температуре колонки 170 °C [5]

Соединение ^а	Степень чистоты, %	Время удерживания относительно карбофурана					
		ультрабонд	3% OV-101	1% OV-17	1% карбовакса 20 M	1% OV-210	0,5% OV-210 + 0,65% OV-17
ЕРТС	99,5	—	0,20	0,08	0,07	—	—
Бутилат	99,5	—	0,25	0,09	0,07	—	—
Пебулат	99,0	—	0,25	0,12	0,09	—	—
Вернолат	99,0	—	0,28	0,12	0,08	—	—
Профам	100,0	0,19 ^б	0,31	0,19	0,22	—	0,22
Диаллат	99,0	0,20	0,67	0,31	0,21	0,32	0,28
Меобал	99,0	0,33	0,59	0,42	0,52	0,56	0,50
CDEC	99,5	0,34	0,66	0,40	0,30	0,40	0,37
Пирамат	98,0	0,35	0,62	0,43	0,29	0,39	0,36
Триаллат	99,5	0,53	1,01	0,48	0,26	0,39	0,38
Пропоксур	98/99	0,55	0,55	0,48	0,53	0,63	0,52
2,3,5-Ландрин	98,0	0,60	0,69	0,51	0,58	0,65	0,58
Хлорпрофам	99,5	0,61	0,66	0,45	0,59	0,56	0,55
Бакс	98,0	0,78	1,04	0,72	0,71	0,75	0,71
Тербутол	98,0	0,82	1,47	0,91	0,66	0,82	0,78
3,4,5-Ландрин	98,0	0,85	0,94	0,78	0,85	0,88	0,85
Бентиокарб	98,0	0,85	1,80	1,26	0,82	0,75	1,02
Аминокарб	98,0	0,93	1,07	0,89	0,95	1,02	0,94
Мексакарбат	99,0	0,98	1,32	0,98	0,94	1,02	0,96
Карбофуран	99,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
SWEP	98,0	1,36	1,19	0,97	1,47	1,19	1,28
Диметилан	98,0	1,37	1,79	1,93	1,38	1,86	1,64
Метиокарб	99,0	2,10	2,25	2,13	2,28	1,96	2,20
Карбарил	99,5	2,75	2,48	2,41	3,10	2,81	2,82

^а Фирменные названия.

^б Температура колонки 150 °C.

как метода прямого определения 32 пестицидов — производных карбаминовой кислоты. В качестве неподвижной фазы опробованы ультрабонд (модифицированный карбоваксом 20 М носитель) и ультрабонд, покрытый жидкой фазой OV-101 (3%), OV-17 (1%), OV-210 (1%), карбоваксом 20 М (1%) или смесью OV-210 (0,5%) и OV-17 (0,65%). Для обнаружения карбаматов использовали электролитический детектор по электропроводности. Об отсутствии каких-либо превращений карбаматов в процессе хроматографического разделения судили по данным хроматомасс-спектрометрии с химической ионизацией. Хотя множество пестицидов—производных карбаматов—не подвергаются каким-либо изменениям в ходе разделения на модифицированном карбоваксом 20 М носителе (покрытом дополнительно жидкой фазой или без таковой), авторы работы [5] подчеркивают, что анализ этих соединений следует проводить при умеренных температурах колонки ($<185^{\circ}\text{C}$) и ограничивать время разделения. Карбарил оказался единственным пестицидом из группы карбаматов, который в указанных условиях подвергается заметному разложению (около 50%). На колонке со смешанной фазой OV-201/OV-17 в изотермических условиях можно разделить 11 пестицидов, а в режиме программирования температуры — до 15 карбаматов с разрешением до базовой линии. Использование электролитического детектора позволяет снизить предел обнаружения карбаматов в образцах почвы до величины порядка $10^{-5}\%$. Исчерпывающее извлечение карбаматов из образцов почвы было достигнуто путем их экстракции слегка щелочными водными растворами, содержащими ацетон, бикарбонат и хлорид натрия.

13.2.2. Симм-Триазины

ГЖХ является наиболее популярным методом анализа гербицидов ряда триазина, которые относятся к наиболее широко используемым пестицидам. Методы анализа триазинов рассмотрены в обзорах [27—29] и в работах [30—35]. Чаще всего *симм*-триазины определяют в различных образцах хроматографированием на неподвижных фазах на основе силиконов (OV-101, SE-30, DC-200, OV-17, QF-1), полиэфиров (DEGS, реоплекс 400), полиэтиленгликоля (карбовакс 20 М) и полиамида (версамид 900). Наиболее эффективным для анализа триазинов считается азот-селективный электролитический детектор по электропроводности. Благодаря высокому массовому содержанию азота в *симм*-триазинах этот детектор позволяет зачастую проводить определение на уровне долей нанограмма, в то время как предел обнаружения с помощью ДЭЗ варьирует в пределах от долей нанограмма до нескольких микрограммов в за-

висимости от природы исходного триазина и содержащихся в его молекуле заместителей. ДЭЗ обладает максимальной чувствительностью по отношению к хлор-*симм*-триазинам и минимальной — по отношению к метокси-*симм*-триазинам [36]. Хотя большинство лабораторий, специализирующихся на определении микроколичеств пестицидов, оснащены ДЭЗ, многие из них не располагают ни азот-селективными электролитическими детекторами по электропроводности, ни пламенно-ионизационными детекторами со щелочными металлами (ПИД-ЩМ) [36].

Бейли и др. [36] описали методику ГЖХ-анализа 10 триазиновых гербицидов в виде их гептафторбутирильных производных и привели примеры определения этих соединений в продуктах питания. В результате обработки *симм*-триазинов гептафтормасляным ангидридом в бензоле в присутствии триметиламина или пиридина, выполнявших роль катализаторов, образовывались в основном моногептафторбутирильные производные, однако в некоторых случаях наблюдалось образование и небольшого количества дипроизводных. Чувствительность определения гептафторбутирильных производных при помощи ДЭЗ в 300 раз превосходила чувствительность определения немодифицированных триазинов. Гептафторбутирильные производные определяли также при помощи электролитического детектора по электропроводности, причем в режиме настройки по галогену чувствительность определения производных была в 5—10 раз выше, чем исходных соединений, а в режиме настройки этого детектора по азоту чувствительность определения исходных и модифицированных триазинов была одинаковой. При разделении на неподвижных фазах OV-1, OV-101, OV-101/QG-1 и OV-210 гептафторбутирильные производные элюируются из колонки в той же последовательности, что и исходные триазины. Этим методом удалось с успехом определить содержание различных триазинов (например, симазина, атразина, пропазина, тербутилазина, аметрина, прометрина, тербутрина, атратона и прометона) на уровне $(1,3—8,6) \cdot 10^{-5}\%$ в картофеле, горохе и помидорах, обработанных указанными гербицидами. Согласно данным работ [27, 29, 37], разделение немодифицированных *симм*-триазинов происходит наиболее эффективно на таких неподвижных фазах, как DEGS, версамид 900 или карбовакс 20 М (2—10%), однако позднее было установлено [38], что сложные смеси хлор-, метокси- и метилтио-*симм*-триазинов не поддаются разделению даже на карбоваксе ни в изотермическом режиме, ни в режиме программирования температуры [38].

Матисова и др. [39] разделили сложную смесь 17 хлор-, метокси- и метилтио-*симм*-триазинов при помощи ГЖХ высокого разрешения на капиллярной колонке 1,3 м×3 мм (внутр. диам.),

Таблица 13.2. Коэффициенты удерживания Ковача (I) и их зависимость от температуры ($\delta I/\delta T$) для *симм*-триазинов (стеклянная капиллярная колонка с неподвижной фазой карбовакс 20 М) [39]

Фирменное название	Заместители в положении			I (463K)	δI (20 °C)
	2	4	6		
Ипазин	Cl	$N(C_2H_5)_2$	$NHCH(CH_3)_2$	2475,1	18,6
	Cl	$NHC(CH_3)_3$	$NHC(CH_3)_3$	2518,4	14,6
Триэтазин	Cl	$N(C_2H_5)_2$	NHC_2H_5	2559,3	20,7
Пропазин	Cl	$NHCH(CH_3)_2$	$NHCH(CH_3)_2$	2659,1	15,1
Третбутилазин	Cl	NHC_2H_5	$NHC(CH_3)_3$	2686,1	18,5
Атразин	Cl	NHC_2H_5	$NHCH(CH_3)_2$	2747,3	18,6
Симазин	Cl	NHC_2H_5	NHC_2H_5	2833,9	21,4
Прометон	OCH_3	$NHCH(CH_3)_2$	$NHCH(CH_3)_2$	2570,3	12,1
Тербутон	OCH_3	NHC_2H_5	$NHC(CH_3)_3$	2597,9	15,3
Атратон	OCH_3	NHC_2H_5	$NHCH(CH_3)_2$	2633,4	14,4
Секбуметон	OCH_3	NHC_2H_5	$NHCH(CH_3)C_2H_5$	2707,8	15,1
Симетон	OCH_3	NHC_2H_5	NHC_2H_5	2714,1	17,9
Прометрин	SCH_3	$NHCH(CH_3)_2$	$NHCH(CH_3)_2$	2779,6	19,1
Третбутрин	SCH_3	NHC_2H_5	$NHC(CH_3)_3$	2812,1	22,8
Аметрин	SCH_3	NHC_2H_5	$NHCH(CH_3)_2$	2859,3	22,5
Десметрин	SCH_3	$NHCH_3$	$NHCH(CH_3)_2$	2888,9	25,9
Симетрин	SCH_3	NHC_2H_5	NHC_2H_5	2937,1	26,1

содержащей 3% карбовакса 20 М на хромосорбе WAW (размер частиц 80—100 меш; температура колонки 214 °C; детектор пламенно-ионизационный). Оптимальную температуру колонки авторы работы определили по кривой зависимости логарифма относительного времени удерживания *симм*-триазинов от обратной температуры ($\lg t_R - 1/T$). Авторы работы [99] нашли коэффициенты удерживания этих соединений (коэффициенты Ковача, I) на стеклянных капиллярных колонках, покрытых в потоке неполярной (OV-101) или полярной (карбоваксом 20 М) жидкой фазой. В табл. 13.2 приведены эти коэффициенты и значения δI (20 °C), характерные для стеклянной капиллярной колонки с карбоваксом 20 М. Стандартное отклонение коэффициентов удерживания Ковача от среднего значения, вычисленного исходя из результатов четырех анализов смеси *симм*-триазинов на этой колонке, составляет 0,1—0,4 ед. Как следует из табл. 13.2, коэффициенты удерживания Ковача зависят от природы заместителя в положении 2 и от степени экранирования атомов азота аминогрупп.

13.2.3. Хлорорганические пестициды

Несмотря на все возрастающие усилия, направленные на ограничение применения некоторых хлорорганических пестицидов, в первую очередь персистентных и легкораспространяю-

щихся в окружающей среде хлорфеноксикарбоновых кислот и циклодиенов, их метаболиты и продукты фотоллиза все еще обнаруживают в различных экологических системах и, причем довольно часто, в организме человека. Поэтому методы определения этих соединений имеют непреходящее значение. Содержание хлорорганических пестицидов (как и загрязняющих окружающую среду хлорпроизводных бифенилов) в окружающей среде, а также в биологических объектах обычно определяют при помощи ГЖХ [40—42]. Данный метод практически вытеснил тонкослойную хроматографию, которая не позволяет определять пикограммовые количества вещества. ВЭЖХ пока не получила широкого распространения в качестве метода определения микроколичеств хлорированных соединений из-за недостаточной чувствительности использовавшихся детекторов [43—45].

Разделение и (или) определение хлорфеноксиалкилкарбоновых кислот (как свободных кислот, так и их производных) проводилось при помощи ГЖХ при исследовании смесей гербицидов [46], воды [47, 48], тканей дикорастущих растений и сельскохозяйственных культур [49—56], пищевых продуктов [57—64], почвы [47, 52, 56, 65, 66] и тканей человека и животных [67—69]; в качестве детекторов при этом использовались микрокулонометрический детектор, ДЭЗ или ПИД. В большинстве методов ГЖХ-анализа хлорфеноксикарбоновые кислоты определяют в виде метиловых [70—73] или пентафторбензиловых эфиров [73—76], получаемых в результате модификации самих кислот или перезэтерификации их эфиров [77, 78]. Применение пентафтобензилбромид в качестве модифицирующего реагента представляет особый интерес, поскольку ДЭЗ отличается высокой чувствительностью по отношению к образующимся производным [79, 80]. Кроме того, пентафторбензиловые эфиры 10 хлорфеноксиалкилкарбоновых кислот в отличие от их метиловых эфиров можно разделить при помощи ГЖХ на DC-200 [73]. Авторы работы [73] изучали хроматографические свойства метиловых эфиров 10 структурно родственных хлорфеноксиалкилкарбоновых кислот и с этой целью сравнили их коэффициенты удерживания на 9 часто используемых неподвижных жидких фазах, различающихся по величине константы МакРейнольдса. Разрешение пентафторбензиловых и метиловых эфиров на каждой из жидких фаз было различным. Однако при определении взаимосвязи между коэффициентом удерживания (I) на неполярной фазе и разностью коэффициентов удерживания на полярной и неполярной фазах (δI) была выявлена хорошая корреляция между структурой соединения и временем его удерживания на колонке.

При помощи ГЖХ проводили количественное определение:

остаточного содержания хлорированных инсектицидов в женском молоке и в жировой ткани человека [81—85]. Крайст и Моузман [85] описали применение колонки с карбоваксом 20 М и детектора Холла для определения оксихлордана, *транс*-нонахлора, диэльдрина, β -гексахлорциклогексана, гептахлорэпоксида, *n*, *n'*-ДДЭ и *n*,*n'*-ДДТ при их содержании в женском молоке и в жировой ткани человека менее 10⁻⁴%. Поскольку присутствующие в некоторых экстрактах вещества липидной природы отрицательно сказываются на работе детектора Холла, их удаляли при помощи гель-хроматографии. Этот прием оказался полезным как дополнительная стадия очистки образцов перед анализом [86—88]. ГЖХ-анализ смеси оксихлордана, *транс*-нонахлора, *n*,*n'*-ДДЭ, *n*,*n'*-ДДТ и диэльдрина проводили на колонке с карбоваксом 20 М, а для определения гексахлорциклогексана, хроматографическая подвижность которого на колонке с карбоваксом 20 М близка к подвижности гептахлорэпоксида, использовали колонку с OV-1 (5%). С целью сравнить способы обнаружения перечисленных выше соединений экстракты образцов анализировали также методом ГЖХ с ДЭЗ. В этом случае разделение проводили на колонке, содержащей смешанную фазу—1,5% OV-17 и 1,95% QF-1. При помощи ГЖХ на колонке, покрытой смесью OV-17 (1,5%) и OV-210 (1,95%), Саксена и др. [89] определяли содержание ВНС, линдана, ДДТ, ДДЭ, ДДД и альдрина в плаценте человека и в сопутствующих жидкостях.

Гексахлорциклопентадиен служит исходным соединением в синтезе многих важных хлорорганических пестицидов, а также средств тушения пожаров и других продуктов промышленного органического синтеза. Октахлорциклопентен является важным полупродуктом производства гексахлорпентадиена и присутствует в незначительных количествах в неочищенном техническом гексахлорциклопентадиене [90]. Авторы работы [90] описали быстрый и чувствительный метод определения этих хлорпроизводных в крови или моче, для проведения которого требуется 5,0 мл биологической жидкости. Хлорпроизводные выделяют из образца экстракцией и определяют посредством ГЖХ на капиллярной колонке с ДЭЗ, а для подтверждения результатов используют хроматомасс-спектрометрию. Метод пригоден для обнаружения и идентификации этих соединений в биологических жидкостях в нанограммовых количествах (нижний предел обнаружения в крови составляет 50 нг/мл, в моче 10 нг/мл).

Определение хлорорганических пестицидов в присутствии полихлордифенилов (ПХД) посредством ГЖХ долгое время считалось трудной задачей, поскольку в рутинном анализе остаточных количеств веществ эти соединения экстрагируются совместно, а время удерживания нескольких ПХД практически

совпадает со временем удерживания ряда хлорорганических пестицидов — в первую очередь пестицидов группы ДДТ [91]. Помехи, обусловленные присутствием ПХД, не поддаются прогнозированию, так как содержание хлора в ПХД может быть самым различным. Обычно ПХД по своим свойствам весьма схожи со многими хлорорганическими пестицидами, поэтому полное отделение последних соединений от ПХД представляет собой чрезвычайно сложную задачу, редко разрешимую при помощи только лишь ГЖХ [92—96]. Лукас и др. [91] описали новый способ определения хлорорганических пестицидов и ПХД в окружающей среде при помощи двух газовых хроматографов, один из которых оснащен микрореактором, и ДЭЗ. В основу метода положено различие в устойчивости хлорорганических пестицидов и ПХД к действию оксида магния (который помещают в микрореактор). Экстракты образцов анализируют дважды: сначала на обычном газовом хроматографе, а затем на газовом хроматографе, оборудованном микрореактором. Сравнивая полученные хроматограммы, можно достаточно надежно идентифицировать компоненты анализируемой смеси.

Авторы работы [97], применив реакции фотоизомеризации, провели ГЖХ-анализ нескольких циклодиеновых инсектицидов в присутствии ПХД. Фотоизомеры этих инсектицидов имеют большие времена удерживания по сравнению с исходными соединениями. В работе [98] сообщается об отделении альдрина, дизельдрина, мирекса, гептахлорэпоксиды и линдана от ПХД и полихлорнафталинов (от арохлора 1242 и галовакса 1013). Для этого использовались две хроматографические системы. Образец сначала наносили на колонку с неполярной неподвижной фазой — 3% апиезона L на хромосорбе W, модифицированном карбоваксом 20 M. При помощи переключающего крана соответствующие фракции переводили на вторую колонку с полярной неподвижной фазой — 10% OV-275 на хромосорбе WAW, на которой в большинстве случаев инсектициды полностью отделялись от ПХД и полихлорнафталинов.

13.2.4. Фосфорорганические пестициды

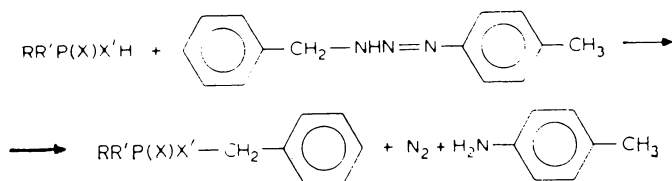
Применение методов газовой хроматографии для анализа фосфорорганических пестицидов рассматривается в ряде обзоров [1, 40, 99]. При проведении количественного анализа этих соединений хроматографисты продолжают отдавать предпочтение пламенно-фотометрическим детекторам, селективным по отношению к фосфор- и серусодержащим соединениям, а также фосфор-селективным термоионным детекторам [40]. В Англии и других европейских странах в последнее время проводилась интенсивная совместная разработка методов одновременного

определения микроколичеств различных фосфорорганических (и других) пестицидов в овощах и фруктах, которые позволили бы удостовериться, что остаточное содержание пестицидов не превышает максимально допустимых пределов. В Англии [101] проводили сравнение методов анализа, разработанных Эббогом и др. [100], учеными из Датского национального пищевого института [101], Уоттсом и др. [102] и Сиссонсом и Теллингом [103, 104]. В других странах проверяли эффективность метода Беккера [105], метода Европейского экономического сообщества [106] и методики совместной дистилляции в потоке [107] при определении остаточных количеств малатиона, диметоата, паратиона, α - и β -хлорфенвинфоса и ометоата в салате, помидорах и капусте. Очищенные экстракты анализировали методом ГЖХ с использованием пламенно-фотометрического детектора и ПИД-ЦМ. Количественное содержание указанных соединений определяли как среднее арифметическое значений, полученных при обнаружении этими двумя детекторами. Ометоат выделяли на хроматографической колонке, содержащей 5% карбовакса 20 М на газохроме Q (размер частиц 80—100 меш), а все остальные пестициды — на колонке, содержащей 5% OV-17 и 0,02% эпона 100 на том же носителе. Результаты пяти параллельных определений указанных пестицидов в салате, помидорах и капусте, проведенных с детекторами двух типов, различаются лишь незначительно. Следовательно, можно считать, что рассмотренные методы контроля качества пищевых продуктов [100, 103, 104, 107] являются приблизительно эквивалентными для данной группы пестицидов и данных видов овощей.

В работе [109] описан метод определения ряда пестицидов — фосфорорганических соединений, фосфотионатов и фосфодитионатов — при помощи ГЖХ с метилированием в блоке. Несколько микрограммов фосфорорганических пестицидов смешивают с метанольным раствором гидроксида триметиланилина и вводят смесь в газовый хроматограф, оснащенный пламенно-фотометрическим детектором с настройкой по фосфору. Полноту протекания реакций различных пестицидов с гидроксидом триметиланилина оценивают по количеству образовавшихся триалкилфосфатов. Эффективность метилирования в блоке в присутствии 0,01 М гидроксида триметиланилина составляет от 61% для фоскима до 100% для азинфосметила. При комнатной температуре эта реакция протекает с довольно низкой скоростью: через 24 ч степень превращения наиболее реакционно-способного пестицида — хлорфоскима — достигает 75%, а мелатион за это же время практически вообще не подвергается метилированию. Хроматографирование проводится на колонках, содержащих 5% OV-225 и 3% OV-275 на хромосорбе WHP (размер частиц 100—120 меш). Как выяснилось, многие фосфор-

органические пестициды перед проведением качественного или количественного анализа целесообразно подвергнуть предварительной обработке с целью получения короткоцепочечных триалкилфосфатов, которые легко поддаются разделению.

Ионогенные алкил- и арилфосфаты, фосфонаты и их тиоаналоги являются метаболитами фосфорорганических пестицидов и ряда других экономически важных химических соединений [110]. В настоящее время не существует единого метода, пригодного для рутинного анализа этих соединений, особенно двухосновных алкилфосфонатов, в образцах биологического и небιологического происхождения. Большинство хроматографических методов, которые включают этерификацию диазоалканами и определение образующихся эфиров с помощью ГЖХ [111], были разработаны для определения диалкилфосфатов и тиофосфатов. В работе [112] описан ГЖХ-анализ различных метаболитов фосфорсодержащих пестицидов в виде бензилпроизводных. Этот метод позволил определить содержание одно- и двухосновных алкил- и арилфосфатов и фосфонатов, а также их тиоаналогов в образцах, извлекаемых из пищевых продуктов при помощи игольчатого пробоотборника, в средах для выращивания бактерий, а также в моче человека. Предел обнаружения каждого пестицида составлял менее 2 пмоль. Водный раствор кислот пропускали через смолу биораd AG 50W-X8 (H⁺), элюат упаривали досуха, к остатку добавляли раствор 3-бензил-1-*n*-толилтриази́на и кипятили в колбе с обратным холодильником. Образующиеся бензильные эфиры количественно экстрагировали циклогексаном и затем анализировали при помощи ГЖХ с пламенным фотометром (в режиме настройки по фосфору) на стеклянной колонке, содержащей 5% OV-210 на газохроме Q (размер частиц 80—100 меш). Бензилирование фосфорных кислот при обработке 3-бензил-1-*n*-толилтриази́ном протекает согласно уравнению



где R — окси- или алкоксигруппа, R' — алкокси-, алкильная или арильная группа, а X и X' — атомы серы или кислорода. Описанным методом можно провести более 20 анализов в день. Обнаружить при помощи ПИД или масс-спектрометра бензильные эфиры значительно легче, чем алкиловые. Более того, введение ароматического остатка значительно увеличивает ко-

эффицент распределения соединения между органической и водной фазой, что позволяет использовать для экстракции разнообразные органические растворители.

13.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Наиболее важным методом определения небольших количеств химических соединений в биологических объектах и в окружающей среде, по-видимому, следует считать ВЭЖХ. Опубликованы обзоры, посвященные общим вопросам ВЭЖХ [114—116] и более конкретным темам, в частности определению остаточных количеств пестицидов [40, 117—119]. Этот метод предпочтителен, например, для определения пестицидов, не обладающих достаточными для ГЖХ летучестью и термической стабильностью [113, 114]. Наиболее важным требованием, предъявляемым к детекторам, предназначенным для определения микроколичеств соединений (на уровне концентраций $10^{-7}\%$), при помощи ЖХ, является, конечно, высокая чувствительность [114]. В большинстве случаев требуются детекторы, которые позволяют обнаружить от 1 до 50 нг вещества.

ВЭЖХ могла бы найти и более широкое применение при наличии селективных детекторов, сравнимых с теми, которые в настоящее время используются в ГЖХ. Среди детекторов, которыми располагают в настоящее время хроматографисты, только УФ- и флуоресцентные детекторы обладают необходимой для определения остатков пестицидов чувствительностью [113, 114, 118—121]. В табл. 13.3 представлены диапазоны чувствительности в УФ-области, необходимые для определения пестицидов различных классов [117]. Естественно, что для обеспечения максимальной чувствительности очень важен выбор подходящей длины волны поглощения. Как следует из табл. 13.3, работая при длине волны ниже 254 нм, часто можно повысить чувствительность определения в 10—100 раз. При анализе остатков пестицидов могут также оказаться полезными перечисленные ниже детекторы, обладающие некоторой селективностью: химические [122—127], с импульсным распылением [128], ПИД-ЩМ [129], ДЭЗ [130], термоионные [131], электролитический кондуктометрический детектор Коулсона [132] и хемилюминесцентные детекторы [133]. Электрохимические детекторы, по-видимому, заслуживают особого внимания, так как эти простые и недорогие приборы, обладающие высокой чувствительностью и некоторой селективностью, в принципе могут заменить традиционные УФ- и флуоресцентные детекторы для колоночной хроматографии [127]. Поскольку нижний

Таблица 13.3. Чувствительность определения пестицидов по поглощению в УФ-области [117]

Класс пестицидов	Чувствительность, мкг ^а	Длина волны, нм
Фенилмочевины	0,03—0,06	254
Фенилкарбаматы	0,05—0,08	254
—	0,005—0,01	207
Метилкарбаматы	0,5—20	254
—	0,2—2	200—206
Триазины	0,1—10	254
—	0,01—0,02	220
Фосфорорганические соединения	0,5—16	254
Феноксикарбоновые кислоты	0,05—0,35	280
Эфиры феноксикарбоновых кислот	15	254
Хлорорганические соединения (типа ДДТ)	1—15	254
Анилиды	0,05	254
Нитрофенолы	0,02—0,05	254
Урацилы	0,2	254
—	0,06—0,07	270—280
Тиокарбаматы	0,07—0,60	205
—	0,3—10	254

^а Количество соединения, необходимое для получения сигнала детектора, эквивалентного 0,01 ед. поглощения.

предел обнаружения многих органических соединений, имеющих приемлемый окислительно-восстановительный потенциал, составляет от 10^{-10} до 10^{-14} моль в образце [126], жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием может оказаться весьма полезной при определении микроколичеств соединений. Этот метод часто позволяет обнаруживать пикограммовые количества соединений, что в ГЖХ с ДЭЗ достижимо только после превращения анализируемого соединения в соответствующее производное [126]. Применение жидкостной хроматографии с электрохимическим детектором в аналитических целях рассмотрено в обзоре [134].

13.3.1. Карбаматы

В работе [117] приведены данные ВЭЖХ-анализа 166 пестицидов, в том числе 37 карбаматов, описаны условия разделения (тип сорбента, размеры колонки, состав подвижной фазы), указаны объемы элюирования, типы образцов и использовавшихся детекторов. Основным потенциальным преимуществом ВЭЖХ является возможность анализа немодифицированных карбаматов, поскольку анализ проводится в относительно мягких условиях. В литературе описаны различные методы ВЭЖХ-анализа разнообразных карбаматов [4, 113, 117, 135—143]. Для

обнаружения немодифицированных карбаматов используют УФ-детекторы [4, 135—137], а флуоресцирующие производные, получаемые с целью увеличения чувствительности метода, обнаруживают при помощи флуориметров [138—143]. Имеющиеся в продаже УФ-детекторы при оптимальной длине волны (190—210 нм) позволяют обнаруживать несколько нанограммов карбамата [135]. Характерный для флуоресцентных детекторов предел обнаружения составляет 1—10 нг для дансильных производных, получаемых до разделения [138, 139], и от 500 пкг [143] до 1—10 нг [138, 141] для производных, получаемых путем обработки элюата фталевым альдегидом.

Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с обнаружением электрохимическим детектором, описанный в работе [127], пригоден для определения в пробах воды микроколичеств некоторых карбаматных пестицидов, имеющих важное значение и повсеместно применяемых. Авторы работы использовали электрохимический детектор с тонкослойным графитовым электродом на кель- F («твердом» тефлоне) в окислительном амперометрическом режиме при постоянном потенциале $+1,1$ В относительно электрода сравнения $Ag|AgCl|3,5$ М KCl . Разделение проводили на колонке 250×42 мм (внутр. диам.), наполненной корасилом бондапак C_{18} . Калибровочные кривые были линейными в широком диапазоне концентраций образца (обычно в пределах по крайней мере трех порядков), причем в большей части диапазона относительное стандартное отклонение повторного измерения составляло 1—2%. Пределы обнаружения восьми карбаматов в образцах объемом 20 мкл находились в диапазоне 40—140 пкг (отношение сигнал:шум 2:1), что соответствовало их концентрациям в образцах $(2-7) \cdot 10^{-4}\%$. Поскольку в жидкостной хроматографии увеличение объема вводимого образца не сказывается в заметной степени на качестве разделения [144], предел обнаружения большинства изученных карбаматов можно снизить до величины порядка $10^{-5}\%$ простым увеличением объема образца до 100 мкл. Мойе и др. [140] опубликовали метод ВЭЖХ-разделения и определения семи карбаматных инсектицидов, в основе которого лежит получение флуоресцирующих производных путем обработки элюата фталевым альдегидом. Этот метод представляет интерес в связи с тем, что благодаря высокой интенсивности флуоресценции образующегося в результате реакции флуорофора можно обнаруживать нанограммовые количества карбаматных инсектицидов. Более того, детектор реагирует только на появление флуорофора и тех соединений, которые флуоресцируют при этих же длинах волн возбуждения и эмиссии.

В работе [141] описана усовершенствованная методика получения флуоресцирующих производных в элюате пяти карба-

матных инсектицидов (карбарила, карбофурана, метиокарба, метомила и пропоксура) и двух метаболитов (3-окси-карбофурана и β -нафтола). Указанные соединения разделяли при помощи метода ВЭЖХ на колонке, заполненной μ -бондапаком C_{18} , в режиме градиентного элюирования водным метанолом при скорости потока 1,5 мл/мин. К элюату со скоростью

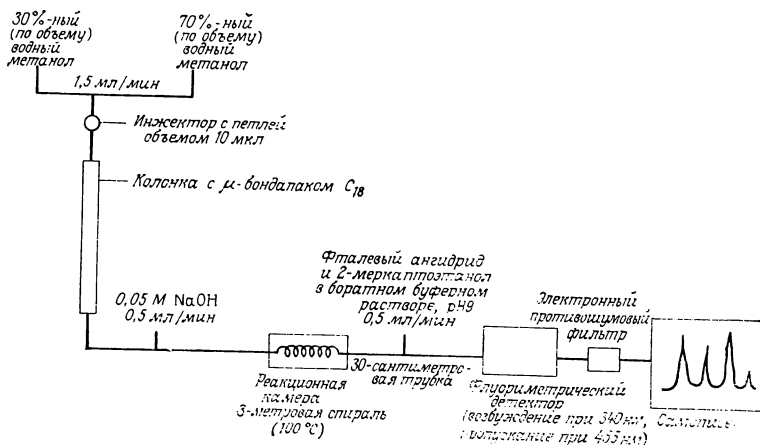


Рис. 13.1. Флуориметрический ВЭЖХ-анализатор карбаматов [141] (с разрешения авторов).

0,5 мл/мин добавляли 0,05 М раствор NaOH, а по окончании гидролиза карбаматов до метиламина (16 с при 100 °C) с той же скоростью подавали раствор фталевого альдегида (0,5 мг/мл) и 2-меркаптоэтанола (1 мкл/мл). Образующийся флуорофор обнаруживали и определяли при помощи флуоресцентного детектора, оснащенного проточной кюветой объемом 10 мкл. Изучение стабильности работы системы в течение 7 сут показало, что для семи соединений относительное стандартное отклонение измерения высоты пика и времени его удерживания составляло соответственно 3,5 и 1%. Схема предложенного автором работы [141] флуориметрического ВЭЖХ-анализатора карбаматов представлена на рис. 13.1. По данным автора, эта система обладает необходимыми для рутинного анализа остаточных количеств пестицидов чувствительностью, линейным диапазоном и стабильностью.

13.3.2. симм-Триазины

Для определения остаточных концентраций симм-триазинов ВЭЖХ вплоть до настоящего времени применялась не особенно часто. В обзоре [117] наряду с данными по разделению

166 пестицидов с помощью ВЭЖХ приводятся таблицы операционных параметров для анализа 15 *симм*-триазинов, которые первоначально хроматографировали на лихросорбе Si 60 (5 мкм). В качестве подвижной фазы при этом использовали 2%-ный изопропанол в триметилпентане. Продукты обнаруживали по поглощению при 254 и 220 нм; предел обнаружения при этих длинах волн равен соответственно 0,1—10 и 0,01—0,02 мкг.

13.3.3. Хлорорганические пестициды

Если методика определения хлорорганических пестицидов при помощи ГЖХ разработана достаточно хорошо, то анализ соединений этого класса с помощью ВЭЖХ еще только изучается. Отчасти это, по-видимому, объясняется отсутствием общедоступных селективных методов обнаружения хлорорганических пестицидов после разделения их посредством обращенно-фазовой хроматографии. Предел обнаружения хлорорганических пестицидов (типа ДДТ) и эфиров феноксикарбоновых кислот по поглощению при 254 нм составляет 1—15 и 15 мкг соответственно (см. табл. 13.3) [117].

Пытаясь повысить чувствительность определения хлорорганических пестицидов с помощью ВЭЖХ, Долан и Зибер [132] сконструировали усовершенствованный вариант электролитического кондуктометрического детектора Коулсона (ЭКДК). Для этого детектора характерна высокая селективность определения хлорорганических соединений (по сравнению с углеводородами), его линейный диапазон соответствует изменению величины концентрации в пределах пяти порядков, а нижний предел обнаружения линдана составляет 5—50 нг. При анализе хлорсодержащих алифатических пестицидов ЭКДК превосходит УФ₂₅₄-детектор по чувствительности, а УФ₂₂₀-детектор по селективности определения. Применимость ЭКДК в аналитической системе была продемонстрирована на примере анализа необработанных экстрактов листьев салата и речной воды, содержащих альдрин и дieldрин в концентрации менее 10⁻⁴%. Пытаться применить в данном случае УФ-детектор с длиной волны 254 или 220 нм бесполезно.

Чтобы оценить селективность системы ВЭЖХ—ЭКДК, авторы работы [132] провели разделение при помощи указанной системы 37 пестицидов и родственных соединений — представителей самых различных классов химических соединений. Как видно из табл. 13.4, введение в молекулу атомов хлора или фтора, как правило, приводит к усилению сигнала детектора, причем в группе родственных соединений величина сигнала возрастает с увеличением содержания галогена. Если анализиру-

Таблица 13.4. Сигнал ЭКДК и отношение сигналов ЭКДК и УФ₂₅₄ для пестицидов и родственных химических стандартов [132]

Соединение	Удержива- ние относи- тельно <i>n,n'</i> -ДДТ	Гетероатом	Сигнал	
			ЭКДК (пло- щадь/пкмоль)	ЭКДК/УФ ₂₅₄
Мирекс	2,39	Cl ₁₂	207	—
Гептахлор	0,94	Cl ₇	113	26,3
Гептахлорэпоксид	0,72	Cl ₇	105	25,0
Гексахлорбензол	2,15	Cl ₆	101	0,46
Альдрин	1,21	Cl ₆	84	6,98
Диэльдрин	0,84	Cl ₆	77	10,4
Линдан	0,62	Cl ₆	71	—
Эндрин	0,84	Cl ₆	66	4,06
<i>o,n'</i> -ДДТ	1,08	Cl ₅	56	1,23
<i>n,n'</i> -ОДДД	0,76	Cl ₄	41	1,33
Пентахлорнитробензол	1,01	Cl ₅	41	0,24
Пентахлоранизол	0,95	Cl ₅	40	0,64
<i>n,n'</i> -ДДТ	1,00	Cl ₅	40	0,58
<i>n,n'</i> -ДДЭ	1,15	Cl ₄	40	0,03
Метоксихлор	0,73	Cl ₃	40	0,10
Трифлуралин	0,78	F ₃ N ₃	36	0,008
Дурсбан	0,79	Cl ₃ NPS	36	1,04
Кельтан	0,81	Cl ₅	35	1,16
Роннель	0,78	Cl ₃ PS	31	3,66
Пентахлорфенол	0,37	Cl ₅	30	0,04
Кептан	0,53	Cl ₃ NS	30	2,41
Пертан	1,04	Cl ₂	20	0,51
Дихлорбензофенон	0,71	Cl ₂	15	0,01
Параоксон	0,50	NP	11	0,16
Дисистон	0,63	PS ₃	11	1,33
<i>n,n'</i> -ДДТ	0,47	Cl ₂	10	0,33
2,4-Д	0,49	Cl ₂	10	0,73
Паратион	0,59	NPS	9,9	0,02
Абат	0,72	P ₂ S ₃	8,3	0,01
Гутион	0,55	N ₃ PS ₂	7,1	0,02
Фосдрин	0,49	P	7,1	—
Мета-систокс-R	0,47	PS ₂	6,5	—
Азодрин	0,47	NP	5,1	—
Метилпаратион	0,53	NPS	4,1	0,01
Омит	0,76	S	3,8	0,65
Метомил	0,49	N ₂ S	2,3	—
Карбарил	0,50	N	0,08	0,004

ются хлорпроизводные, сигнал детектора до некоторой степени зависит от структуры соединения (ср., например, эндрин и гексахлорбензол), что указывает на необходимость сжигания веществ при температуре выше 975°C (чтобы устранить межгалогенную селективность). Более того, величина сигнала детектора зависит также от природы других функциональных групп, содержащихся в хлорорганических пестицидах.

13.3.4. Фосфорорганические пестициды

Как метод анализа остатков фосфорорганических пестицидов ВЭЖХ не получила должного распространения [117, 122, 145—147]. Эти соединения обнаруживают по поглощению при 254 нм [145, 147], по ингибированию холинэстеразы [146] и полярографически [122]. Чувствительность определения фосфорорганических пестицидов по поглощению при 254 нм колеблется от 0,5 до 16 мкг [117, 145, 147]. Для определения остаточных количеств фосфорорганических инсектицидов и карбаматов авторы работы [146] использовали систему ВЭЖХ в сочетании с автоматическим анализатором ингибиторов холинэстеразы. Была проверена возможность определения указанным способом следующих фосфорорганических соединений: диазоксона, дихлорофоса, дикротофоса, монокротофоса, фосфамидона, диметила, диоксакарба и соединения CGA 18809. Ориентировочные пределы обнаружения перечисленных соединений соответствуют интервалу от 10 пкг (диазоксон) до 200 нм (диоксакарб). В большинстве случаев эти пределы удовлетворяют требованиям анализа остатков; причем следует отметить, что содержащиеся в экстракте другие ингибиторы холинэстеразы определению не мешают. Метод ингибирования холинэстеразы имеет еще одно преимущество по сравнению с другими методами определения остаточных количеств карбаматов: предварительный гидролиз и (или) получение производных в данном случае не нужны.

Комптон и Пурди [148] продемонстрировали применимость в ВЭЖХ фосфор-чувствительных детекторов для селективного обнаружения фосфорорганических соединений. Установив в верхней части обычного ПИД бусины из рубидий-силикатного стекла, эти авторы получили термоионный детектор (ТИД). Любой детектор типа ТИД в принципе позволяет обнаруживать фосфорорганические соединения с более высокой (по сравнению с углеводородами) чувствительностью и селективностью; следовательно, такие детекторы могут представлять определенную ценность для количественного и качественного анализа этих соединений в сложных смесях. Чувствительность обнаружения некоторых фосфорорганических пестицидов при помощи ТИД в 500 раз выше, чем чувствительность их обнаружения при помощи ПИД, и, как полагают, чувствительность первых может быть еще более высокой.

13.3.5. Производные мочевины

Самые различные производные мочевины принадлежит к числу наиболее широко используемых гербицидов. Определение их остаточных количеств все чаще проводится при помощи

ВЭЖХ, поскольку этот метод обладает определенными преимуществами по сравнению с ГЖХ [117, 149—152]. Например, в обычных для ГЖХ-анализа условиях некоторые фенилпроизводные мочевины разлагаются до изоцианатов [153]. Поскольку в процессе ВЭЖХ-анализа этого не происходит, с помощью этого метода гербициды — производимые мочевины — можно отделить от их метаболитов. Эти соединения обычно обнаруживают по поглощению в УФ-области; предел обнаружения фенилпроизводных мочевины по поглощению при 254 нм составляет от 0,03 до 0,06 мкг [117].

13.4. Хроматомасс-спектрометрия

Хорошо известно, что, объединив несколько аналитических методов, можно существенно улучшить характеристики исходного метода анализа [154]. Так, хроматомасс-спектрометрия (ХМС) — наиболее мощный и полезный современный метод определения микроколичеств органических соединений. Он позволяет получить качественную информацию о веществах, присутствующих в образце в нанограммовых количествах, в виде масс-спектра каждого соединения, элюируемого из колонки газового хроматографа. В литературе обсуждаются и теоретические основы этого метода [155—160], и наглядные примеры его использования [156, 157, 159, 160].

13.4.1. Хлорорганические пестициды

ХМС все в больших масштабах применяется для оценки степени токсичности окружающей среды. Начиная с 1975 г., когда выяснилось, что окружающая среда вблизи единственного в США предприятия, производящего пестицид кепон, загрязнена этим соединением, ведется интенсивное методическое изучение его токсичности [161]. Харлесс и др. [161] показали, что ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения с химической ионизацией позволяет обнаруживать кепон и подтверждать присутствие этого пестицида и продуктов его восстановления и фотодеструкции в окружающей среде и в организме человека. При анализе образцов на присутствие в них кепона масс-спектрометр работал в режиме обнаружения четырех самых крупных ионов (при m/z 488,7, 490,7, 492,7 и 494,7) в области квазимолекулярного иона ($M+H$). Предел обнаружения кепона в стандартном растворе составляет 700 пкг. Данные табл. 13.5 иллюстрируют примеры использования ХМС с химической ионизацией для подтверждения наличия кепона в окружающей среде и организме человека.

Таблица 13.5. Данные анализа, проведенного при помощи ХМС с химической ионизацией, подтверждающие присутствие кепона в окружающей среде и организме человека [161]

Образец	Диапазон концентраций, 10^{-4} %	Число образцов
Вода	0,15—3,38	3
Воздух	0,21—54,8 мкг/м ³	18
Почва, ил, донные отложения	1,31—13 250	3
Рыба	1,04—14,4	10
Моллюски	0,18—0,91	10
Секрет сальных желез человека	0,05—3,06 мкг в образце, полученном при одном промакивании лба	10
Кровь человека ^a	2—15	2
Кал человека	2—5	2
Желчь человека ^a	0,1—1,5	3

^a Неопубликованные данные.

В работе [162] сообщается о количественном определении мирекса и продуктов его разложения в тканях рыб и в донных отложениях при помощи капиллярной ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Как показали исследования, у значительной части населения США [163, 164], западной Европы [165] и Японии [166] в организме обнаружен пентахлорфенол в концентрациях, приблизительно составляющих 0,001 летальной дозы ПХФ для человека, что является предметом глубокой озабоченности. Существует мнение [168], что появление пентахлорфенола в организме человека по крайней мере отчасти обусловлено тем, что это соединение образуется в процессе метаболизма гексахлорбензола в организме млекопитающих.

Кюэль и Даферти [169] при помощи ХМС с химической ионизацией отрицательными ионами получили данные об источниках пентахлорфенола, загрязняющего окружающую среду. Коммерческий пентахлорфенол содержит в качестве примеси значительные количества тетрахлорфенола. Наличие последнего в окружающей среде показывает, что источником пентахлорфенола являются химические препараты, содержащие это соединение. Концентрацию тетрахлорфенолов в таких препаратах, окружающей среде и организме человека авторы работы оценивали по величине ионного тока при m/z 229, а концентрацию тетрахлорфеноксида и ПХФ — по величине ионного тока при m/z 267. Определение ПХФ в жировой ткани жителей Японии проводили при помощи ГЖХ и ХМС [170].

13.4.2. Хлорированные дибензо-*p*-диоксины

Полихлорзамещенные дибензо-*p*-диоксины (ХДД), условия их образования и распространения, персистентность, распространенность и токсичность являются предметом постоянного внимания ученых. Открытие, что при сгорании некоторых хлорфенолов и феноксипроизводных, а также при их использовании в качестве гербицидов в окружающую среду могут выделяться ХДД, потребовало разработки весьма сложной методики их определения. Дело в том, что в настоящее время идентифицировано 75 позиционных изомеров ХДД от моно- до октахлорпроизводных [в том числе 22 изомера только тетрахлордибензодиоксинов (ТХДД)], которые значительно различаются по степени токсичности и биологической активности. Наиболее токсичным изомером в настоящее время считается 2,3,7,8-ТХДД. Утечка этого соединения привела к нескольким несчастным случаям на производстве и послужила причиной опасного загрязнения окружающей среды в итальянском городе Севезо [171].

Для изучения биоаккумуляции ХДД в биологических объектах и в окружающей среде была разработана методика анализа остатков диоксинов на пикограммовом уровне. Большая часть работ в этой области, опубликованных до 1974 г., представлена в обзоре [172]. В более поздних работах описывается ряд основанных на ХМС методик определения ХДД в биологических образцах и окружающей среде на уровне $10^{-10}\%$ [173—192].

Точность масс-спектрометрического определения ТХДД на уровне $10^{-10}\%$ во многих образцах из биологических и природных источников зависит от уровня их загрязненности такими соединениями, как ДДТ, ПХБ и токсафен (микропримесь), которые мешают проведению анализа [193, 194]. Следовательно, операция очистки образца, предназначенного для определения ТХДД, должна быть как можно более селективной [184, 186, 187]. В ряде работ описаны методы определения ТХДД на уровне $10^{-10}\%$ в экстрактах, основанные на использовании масс-спектрометрии высокого разрешения [194, 195], газовой хроматографии на насадочных колонках в сочетании с масс-спектрометрией высокого и низкого разрешения [176, 191, 192], газовой хроматографии высокого разрешения в сочетании с масс-спектрометрией низкого разрешения [183], ХМС с химической ионизацией отрицательными ионами [185], капиллярной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с химической ионизацией в атмосфере отрицательных ионов [187] и капиллярной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения [190].

В работе [190] приводится методика экстракции и предвари-

тельной очистки образцов перед определением ТХДД в низких концентрациях (на уровне пкг/г) в женском молоке, печени крупного рогатого скота, воде и в донных отложениях при помощи капиллярной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Средний выход продукта составляет 80% при содержании [$^{37}\text{Cl}_4$] ТХДД (внутренний стандарт) от 2,5 до 10 нг. Этот метод позволяет определить от 1 до 1250 пкг ТХДД с точностью $\pm 23\%$. Воспроизводимость результатов анализа стандартных образцов, содержащих от 2 до 10 пкг ТХДД, проведенных в течение одного дня, составляла $\pm 20\%$. Авторы работы [187] объединили капиллярную газовую хроматографию и масс-спектрометрию с химической ионизацией в атмосфере отрицательных ионов для определения ТХДД в тканях рыб и диких животных. ТХДД выделяли из образцов ткани при помощи многоступенчатой ВЭЖХ, включающей разделение стабильными изотопами. При этом выяснилось, что ПХБ не мешает определению микроколичеств ($10^{-10}\%$) ТХДД.

Метод определения тетра-, гекса-, гепта- и октахлордibenзо-*n*-диоксинов в женском молоке на уровне $10^{-10}\%$, разработанный и испытанный Лангхорстом и Шадоффом [180], включает следующие этапы: обработку образца кислотой, экстракцию органическим растворителем, многостадийную предварительную очистку на сорбентах, две стадии разделения при помощи ВЭЖХ и, наконец, ХМС-анализ в режиме сканирования масс-спектров. Этот метод обеспечивает эффективное выделение 2,3,7,8-ТХДД и 18 других изомеров ТХДД, а также гекса-, гепта- и октахлордibenзо-*n*-диоксинов. Носителями и внутренними стандартами служат диоксины, меченные ^{13}C . Данный метод, как установлено, пригоден для определения 2,3,7,8-ТХДД на уровне $(1-12) \cdot 10^{-10}\%$ и других ТХДД, гепта-ХДД и окта-ХДД в более высоких концентрациях того же порядка. На рис. 13.2 представлена схема фракционирования, включающего обращенно-фазовую хроматографию, адсорбционную ВЭЖХ на силикагеле и ГЖХ на насадочной колонке, которое позволяет отделить 2,3,7,8-ТХДД от его остальных изомеров. Такое фракционирование обеспечивает эффективное удаление примесей, мешающих определению. Авторы работы [196] продемонстрировали эффективность удаления ПХБ, ДДЭ и полихлорбензилфениловых эфиров из образцов тканей рыб при помощи жидкостной хроматографии на основном оксиде алюминия и на обращенных фазах. Полагают, что 10^6 -кратный избыток этих соединений не будет мешать определению диоксина.

Бусер и Раппе [189] провели разделение 22 изомерных ТХДД на стеклянных капиллярных колонках высокого разрешения с различными неподвижными фазами (силар 10С, OV-17, OV-101), используя для определения этих соединений масс-спектромет-

рию с химической ионизацией. Силар 10С позволяет однозначно идентифицировать наибольшее число изомеров, включая 2,3,7,8-ТХДД. Некоторые изомеры, например 1,2,7,8-, 1,2,7,9- и 1,2,3,9-ТХДД, можно идентифицировать при помощи ГЖХ на OV-101, а 1,2,3,6-ТХДД можно идентифицировать на OV-17. Наглядными примерами применения данного метода для определения различных изомеров ТХДД могут служить анализы об-

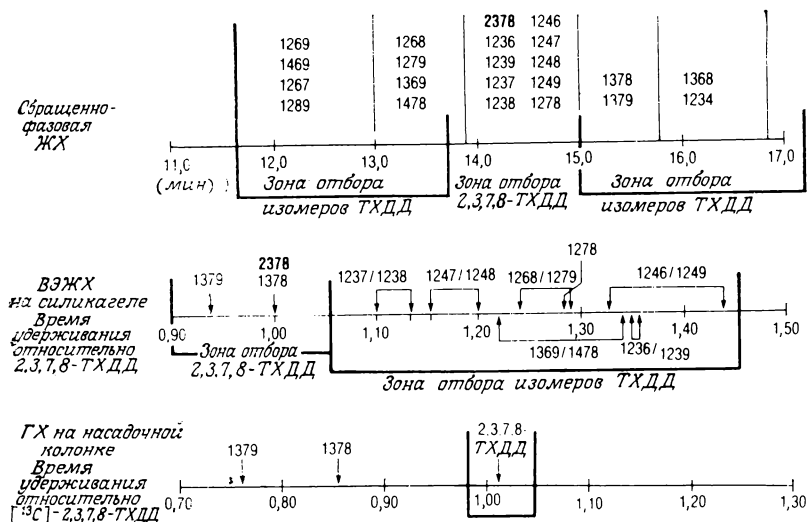


Рис. 13.2. Схема выделения 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксина (2,3,7,8-ТХДД) из смеси 22 изомеров тетрахлордиоксина с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, адсорбционной ВЭЖХ на силикагеле и газовой хроматографии на насадочной колонке [180] (с разрешения авторов).

разцов, взятых в заведомо зараженных ТХДД зонах — в г. Севезо (Италия) и в восточной части шт. Миссури (США). Этот метод также применяли для анализа образцов тканей рыб из реки Титтабавасси (шт. Мичиган) и образцов сажи муниципальных станций сжигания мусора в Швейцарии.

Нестрик и др. [197] разработали метод, который позволяет проводить сбор данных о продуктах фотолиза 22 изомерных ТХДД. Для определения каждого соединения требуется всего 1 нг материала. Эти авторы определили время полураспада в результате фотолиза каждого из изомеров ТХДД; с этой целью разбавленные растворы ТХДД в углеводородных растворителях и их диффузные молекулярные дисперсии на поверхности травленного стекла выдерживали на свету в одних и тех же условиях. Для определения молекулярной структуры каждого изомера ТХДД использовали технику распознавания образцов,

чтобы соотнести данные по удельной скорости фотолиза с положением замещающих атомов хлора. Этот метод позволяет накапливать данные о фундаментальных свойствах большого числа соединений, недоступных в настоящее время в достаточных количествах. Кроме того, данные по фотодеструкции при очень низких концентрациях веществ могут оказаться особенно ценными для предсказания судьбы ТХДД в экосфере.

13.5. Тонкослойная хроматография

В анализе остатков пестицидов в дополнение к методам классической ТСХ на пластинках или листках бумаги, покрытых слоем сорбента, все чаще применяются ВЭТСХ, ТСХ на слоях с привитыми фазами и количественное определение продуктов денситометрией пластинок [198]. Преимущества ВЭТСХ перед ТСХ — это более высокие скорость, чувствительность и эффективность разделения, экономия растворителей и возможность проведения анализа большого числа образцов на одной пластинке [198—200]. Денситометрия постепенно вытесняет методы визуального определения и элюирования зон в количественном анализе с помощью ТСХ, а также ВЭТСХ на нанограммовом уровне [198], например при определении триазиновых гербицидов [201, 202].

Йорк и Рот [202] сравнили применимость методов ГХ, ВЭЖХ, ТСХ и ВЭТСХ для анализа остаточных количеств *симм*-триазинов. Пределы обнаружения 14 *симм*-триазинов при помощи указанных методов составляют 0,02—0,03 нг ГЖХ с ПИД-ЩМ, 0,8 нг ГЖХ с ПИД, 1 нг ВЭЖХ (УФ-детектор), 3—5 нг ВЭТСХ (УФ-денситометр), 8—13 нг ТСХ (УФ-денситометр). Линейный диапазон определения в первом случае составляет 10^4 , а в трех последних 10^2 . Воспроизводимость определения в этих же случаях при уровне достоверности P , равном 95%, характеризуется коэффициентом вариации $\pm 5\%$. В рутинном анализе, требующем проведения большого числа измерений, ВЭТСХ обладает заметным преимуществом, поскольку длительность одного разделения составляет 40 с.

13.6. Нитрозированные пестициды и загрязнение окружающей среды микроколичествами нитрозаминов

Многие пестициды, применяемые для обработки почвы и растений, могут содержать в качестве примесей нитрозосоединения, и это обстоятельство вызывает все большую озабоченность [203]. Загрязнение пестицидов N-нитрозосоединениями мо-

жет происходить вследствие образования их в процессе производства пестицидов или во время хранения или же в результате использования для производства пестицидов загрязненных аминов. Сильное беспокойство вызывает еще одно обстоятельство: некоторые пестициды могут подвергаться нитрозированию непосредственно в почве, воде и в растениях [203, 204]. К числу пестицидов, которые с наибольшей вероятностью могут подвергаться подобным превращениям, относятся гербициды на основе амидов, триазина, мочевины, карбаматов и динитроанилина [203, 206]. Наиболее важными продуктами, которые, как установлено к настоящему времени, содержат нитрозамины, являются гербициды на основе динитроанилина, в первую очередь трифлуралин (α, α, α -трифтор-2,7-динитро-N,N-дипропил-*n*-толуидин), и *симм*-триазина, в первую очередь атразин [203—206].

Основными методами анализа летучих нитрозаминов и нитрозированных пестицидов являлись ХМС [207—209] и ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектором (термоэнергетический анализатор, ТЭА) [208—213]. Для подтверждения присутствия нитрозаминов в качестве наиболее надежных приняты масс-спектрометрические методы [208, 209]. Если анализируемая смесь относительно проста и анализу предшествовала достаточно эффективная очистка образца, вполне удовлетворительной является масс-спектрометрия низкого разрешения. Анализ сложных образцов, однако, требует более эффективных методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии (например, масс-спектрометрии высокого разрешения). Селективность хемилюминесцентных детекторов обусловлена тем, что при взаимодействии нитрозаминов с озоном свет излучается в ближней ИК-области, тогда как для других известных хемилюминесцентных реакций с участием озона характерно излучение в видимой и ближней УФ-области. Предел обнаружения N-нитрозосоединений при помощи ТЭА составляет несколько пикограммов [208, 210, 212] при линейном диапазоне 10^5 . При проведении рутинного анализа N-нитрозосоединений ТЭА может реагировать и на другие соединения, однако это не создает сложной проблемы, поскольку достоверность идентификации соединения можно легко проверить путем добавления к образцу стандарта [214, 215]. Дополнительное подтверждение можно получить при сравнении результатов ГХ- и ВЭЖХ-анализа [214].

Литература

1. Cram S. P., Risby T. H., Field L. R., Yu W. L. Anal. Chem., 52, 324R (1980).
2. Ruzicka J. H. Proc. Soc. Anal. Chem., 10, 32 (1973).
3. Magallona E. D. Residue Rev., 56, 1 (1975).

4. *Dorough H. W., Thorstenson J. H. J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 212 (1975).
5. *Hall R. C., Harris D. E. J. Chromatogr.*, **169**, 245 (1979).
6. *Zielinski W. L., Fishbein L. J. Gas Chromatogr.*, **3**, 333 (1965).
7. *Lowry S. R., Gray C. R.* — In: *Pesticide Analytical Methodology*./Eds. Harvey J., Jr., Zweig G. Amer. Chem. Soc. Symp. Series 136. DC. Washington: Amer. Chem. Soc., 1980, p. 17.
8. *Wheeler L., Strother A. J. Gas Chromatogr.*, **6**, 110 (1968).
9. *Cook R. F., Stanovick R. P., Cassil C. C. J. Agr. Food Chem.*, **17**, 277 (1969).
10. *Cassil C. C., Stanovick R. P., Cook R. F. Residue Rev.*, **26**, 63 (1969).
11. *Riva M., Carisano A. J. Chromatogr.*, **42**, 464 (1969).
12. *Oda M., Shida N., Kashiwa T. Noyaku Kensasho Hokoku*, **16**, 60 (1976).
13. *Lawrence J. F., Lewis D. A., McLeod H. A. J. Chromatogr.*, **138**, 143 (1977).
14. *Loebering H. G., Weil L., Quentin K. E. Vom Wasser*, **51**, 265 (1978).
15. *Tjan G. H., Jansenn J. T. A. J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 269 (1979).
16. *Seiber J. N. Agr. Food Chem.*, **20**, 443 (1972).
17. *Sherma J., Shafik T. M. Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **3**, 55 (1975).
18. *Holden E. R. J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **56**, 713 (1973).
19. *Sullivan L. J., Eldridge J. M., Knaak J. B. J. Agr. Food Chem.*, **15**, 927 (1967).
20. *Chapman R. A., Robinson J. R. J. Chromatogr.*, **140**, 209 (1977).
21. *Lawrence J. F. J. Chromatogr.*, **123**, 287 (1976).
22. *Kuhr R. J., Dorough H. W. Carbamate Pesticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*, OH. Cleveland: CRC Press, 1976, p. 201.
23. *Zlatkis A., Poole C. F. Anal. Chem.*, **52**, 1002A (1980).
24. *Mount M. E., Oehme F. W. J. Anal. Toxicol.*, **4**, 286 (1980).
25. *Krechniak J., Foss W. Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 531 (1979).
26. *Cohen I. C., Norcup J., Ruzicka J. H. A., Wheals B. B. J. Chromatogr.*, **49**, 215 (1970).
27. *Fishbein J. Chromatogr. Rev.*, **12**, 167 (1970).
28. *Mattson A. M., Kahrs R. A., Murphy R. T. Residue Rev.*, **32**, 32 (1970).
29. *Cochrane W. P., Purkaystha R. Toxicol. Environ. Chem. Rev.*, **1**, 137 (1973).
30. *Lawrence J. F. J. Agr. Food Chem.*, **22**, 137 (1974).
31. *McKone C. E., Byast T. H., Hance R. J. Analyst (London)*, **97**, 653 (1972).
32. *Delley R., Friedrich K., Karlhuber B., Szekely G., Stambach K. Z. Anal. Chem.*, **228**, 23 (1967).
33. *Purkayastha R., Cochrane W. P. J. Agr. Food Chem.*, **21**, 93 (1972).
34. *Greenhalgh R., Cochrane W. P. J. Chromatogr.*, **70**, 37 (1972).
35. *Young H. Y., Chu A. J. Agr. Food Chem.*, **21**, 711 (1973).
36. *Bailey R., LeBel G., Lawrence J. F. J. Chromatogr.*, **161**, 251 (1978).
37. *Fishbein L. Chromatography of Environmental Hazards, Vol. 3. Pesticides.* Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 733.
38. *Ramsteiner K., Hörmann W. D., Eberle D. O. J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **57**, 192 (1974).
39. *Matisová E., Krupčík J., Liška O., Szentiványi N. J. Chromatogr.*, **169**, 261 (1979).
40. *Thornburg W., Anal. Chem.*, **51**, 198R (1979).
41. *Aue W. A. J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 329 (1975).
42. *Gosink T. A. Environ. Sci. Technol.*, **9**, 630 (1975).
43. *Aitzatmüller K. J. Chromatogr.*, **107**, 411 (1975).
44. *Zimmerli B., Marek B. Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, **66**, 362 (1975).

45. Rohleder H., Staudacher M., Sümmerrmann W. Z. Anal. Chem., **279**, 152 (1976).
46. Pursley P. L., Schall E. D. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **48**, 327 (1965).
47. Purkayastha R. J. Agr. Food Chem., **22**, 453 (1974).
48. Choi K. L., Quee Hee S. S., Sutherland R. G. J. Environ. Sci. Health, **B11**, 175 (1976).
49. Yip G. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **45**, 367 (1962).
50. Chow C., Montgomery M. L., Yu T. C. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **6**, 576 (1971).
51. Munro H. E. Pestic. Sci., **3**, 371 (1972).
52. Cochrane W. P., Russell J. B. Can. J. Plant Sci., **55**, 323 (1975).
53. Dupuy A. E., Forehand T. J., Han Tai. J. Agr. Food Chem., **23**, 827 (1975).
54. Allebone J. E., Hamilton R. J. J. Chromatogr., **108**, 188 (1975).
55. Soderquist C. J., Crosby D. G. Pestic. Sci., **6**, 188 (1975).
56. Khan S. U. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **58**, 1027 (1975).
57. Bevenue A., Zweig G., Nash N. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **46**, 881 (1963).
58. Yip G. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **47**, 1116 (1964).
59. Klingman D. L., Gordon C. H., Yip G., Burchfield H. P. Weeds, **14**, 164 (1966).
60. Crosby D. G., Bowers J. B. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **1**, 104 (1966).
61. Duffy T. R., Shelfoon P. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **50**, 1098 (1967).
62. Yip G. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **54**, 966 (1971).
63. Cochrane W. P., Greenhalgh R., Looney N. E. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **59**, 617 (1976).
64. Cochrane W. P., Greenhalgh R., Looney N. E. Can. J. Plant Sci., **56**, 207 (1976).
65. Gutenmann W. H., Lisk D. J. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **47**, 353 (1964).
66. Woodham D. W., Mitchell W. G., Loftis C. D., Collier C. W. J. Agr. Food Chem., **19**, 186 (1971).
67. Rivers J. B., Yaeger W. L., Jr., Klemmer H. W. J. Chromatogr., **50**, 334 (1970).
68. Renberg L., Anal. Chem., **46**, 459 (1974).
69. Nony C. R., Bowman M. C., Holder C. L., Young J. F., Oller W. L. J. Pharm. Sci., **64**, 1810 (1976).
70. Scoggins J. E., Fitzgerald C. H. J. Agr. Food Chem., **17**, 156 (1969).
71. Howard S. F., Yip G. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **54**, 970 (1971).
72. Horner J., Hee S. S. Q., Sutherland R. G. Anal. Chem., **46**, 110 (1974).
73. De Beer J., Van Peteghem C., Heyndrickx A. J. Chromatogr., **157**, 97 (1978).
74. Chau A. S. Y., Terry K. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **59**, 633 (1976).
75. Agemian H., Chau A. S. Y., Analyst (London), **101**, 732 (1976).
76. De Beer J., Van Peteghem C., Heyndrickx A. Meded. Rijksfac. Landbouwwert Gent., **42**, 1739 (1977).
77. Yip G. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **54**, 343 (1971).
78. van Peteghem C., Heyndrickx A. Meded. Rijksfac. Landbouwwet. Gent., **38**, 857 (1973).
79. Kawahara F. K. Anal. Chem., **40**, 1009 (1968).
80. Kawahara F. K. Anal. Chem., **40**, 2073 (1968).
81. Robinson J., Hunter C. G. Arch. Environ. Health., **13**, 558 (1966).
82. Curley A., Kimbrough R. Arch. Environ. Health., **18**, 156 (1969).
83. Dale W. E., Copeland M. F., Hayes W. J., Jr., WHO Bull., **33**, 471 (1965).
84. Brevik E. M. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **19**, 281 (1978).
85. Christ H. L., Moseman R. F. J. Chromatogr., **160**, 49 (1978).
86. Stalling D. L., Tindle R. C., Johnson J. L. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **55**, 32 (1972).

87. Johnson L. D., Waltz R. H., Ussary J. P., Kaiser F. E. J. Ass. Offic. Agr. Chem., **59**, 174 (1976).
88. Tindle R. C., Stalling D. L. Anal. Chem., **44**, 1768 (1972).
89. Saxena M. C., Seth T. D., Mahajan P. L. Int. J. Environ. Anal. Chem., **7**, 245 (1980).
90. DeLeon I. R., Brown N. J., Cocchiara J. P., Miles S. K., Laseter J. L., Kremer E. H., Makk L. J. Anal. Toxicol., **4**, 314 (1980).
91. Luckas B., Pscheidt H., Haberland D. J. Chromatogr., **147**, 41 (1978).
92. Oller W. L., Crammer M. F. J. Chromatogr. Sci., **13**, 296 (1975).
93. Edwards R. Chem. Ind., 1340 (1970).
94. Fishbein L. J. Chromatogr., **68**, 345 (1972).
95. Schulte E., Thier H. P., Acker L. Deut. Lebensm. Rundsch., **72**, 229 (1976).
96. Göke G. Deut. Rundsch., **71**, 309 (1975).
97. Mansour M., Parlar P. J. Agr. Food Chem., **25**, 201 (1977).
98. Paramasigamani V., Kapila S., Aue W. A. J. Chromatogr. Sci., **18**, 191 (1980).
99. Smart N. A., Hill A. R. C., Roughan P. A. Analyst (London), **103**, 770 (1978).
100. Abbott D. C., Crisp S., Tarrant K. R., Tatton J. O. G. Pestic. Sci., **1**, 10 (1970).
101. Report by the Panel on Determination of Residues of Certain Organophosphorus Pesticides in Fruits and Vegetables, Analyst (London), **102**, 858 (1977).
102. Watts R. R., Storherr R. W., Pardue J. R., Osgood T. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **52**, 522 (1969).
103. Sissons D. J., Telling G. M. J. Chromatogr., **47**, 328 (1970).
104. Sissons D. J., Telling G. M. J. Chromatogr., **48**, 468 (1970).
105. Becker G. Deut. Lebensm. Rundsch., **67**, 125 (1971).
106. Dormal van den Bruel, personal communication (see ref. 99).
107. Storherr R. W., Watts R. R. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **51**, 662 (1968).
108. Ebing W. personal communication (see ref. 99).
109. Miles J. W., Dale W. E. J. Agr. Food Chem., **26**, 480 (1978).
110. Coor A. M., Daughton C. G., Alexander M. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 668 (1978).
111. Daughton C. G., Crosby D. G., Garnas R. L., Hsieh D. P. H. J. Agr. Food Chem., **24**, 236 (1976).
112. Daughton C. G., Coor A. M., Alexander M. Anal. Chem., **51**, 1949 (1979).
113. Moye H. A. J. Chromatogr., Sci., **13**, 268 (1975).
114. Lawrence J. F. Anal. Chem., **52**, 1122A (1980).
115. Walton H. F. Anal. Chem., **52**, 15R (1980).
116. Majors R. E. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 186 (1977).
117. Lawrence J. F., Turton D. J. Chromatogr., **159**, 207 (1978).
118. American Chemical Society, Pesticide Analytical Methodology, ACS Symp. Ser. No. 136, DC. Washington: Amer. Chem. Soc., 1980.
119. Ivie K. — In: Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators, Vol. 11./Ed. Zweig G. New York: Academic Press, 1980.
120. Eisenbeiss F., Sieper H. J. Chromatogr., **83**, 439 (1973).
121. Horgan D. F., Jr. — In: Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators. Vol. 7./Eds. Sherma J., Zweig G. New York: Academic Press, 1973.
122. Koen J. G., Huber J. F. K., Poppe H., de Boef G. J. Chromatogr. Sci., **8**, 192 (1970).
123. Kissinger P. T., Refshange C., Dreiling R., Adams R. N. Anal. Lett., **6**, 465 (1973).
124. Fleet B., Little C. J. J. Chromatogr. Sci., **12**, 747 (1974).
125. Buchta R. C., Papa L. J. J. Chromatogr. Sci., **14**, 213 (1976).
126. Bollet C., Oliva P., Caude M. J. Chromatogr., **149**, 625 (1977).

127. *Anderson J. L., Chesney D. J.* Anal. Chem., **52**, 2156 (1980).
128. *Mowery R. A., Jr., Juwet R. S., Jr.* J. Chromatogr. Sci., **12**, 687 (1974).
129. *Slais K., Krejči M. J.* Chromatogr., **91**, 181 (1974).
130. *Willmott F. W., Dolphin R. J.* J. Chromatogr. Sci., **12**, 695 (1974).
131. *Compton B. J., Purdy W. C. J.* Chromatogr., **169**, 39 (1979).
132. *Dolan J. W., Sieber J. N.* Anal. Chem., **49**, 326 (1977).
133. *Bhown A. S., Mole J. E., Weissinger A., Bennett J. C. J.* Chromatogr., **148**, 532 (1978).
134. *Kissinger P. T.* Anal. Chem., **49**, 447A (1977).
135. *Sparacino C. M., Hines J. W. J.* Chromatogr. Sci., **14**, 549 (1976).
136. *Aten C. F., Bourke J. B. J.* Agr. Food Chem., **25**, 549 (1976).
137. *Stoeber I., Reupert R.* Vom Wasser., **51**, 273 (1978).
138. *Frei R. W., Lawrence J. F. J.* J. Chromatogr., **83**, 321 (1973).
139. *Frei R. W., Lawrence J. F., Hope J., Cassidy R. M. J.* Chromatogr. Sci., **12**, 40 (1974).
140. *Moye H. A., Scherer S. J., John P. A.* St. Anal. Lett., **10**, 1049 (1977).
141. *Krause R. T. J.* Chromatogr. Sci., **16**, 281 (1978).
142. *Cochrane W. P. J.* Chromatogr. Sci., **17**, 124 (1979).
143. *Muth J., Giles J.* Altex Chromatogram., **3**, 5 (1980).
144. *Karger B. L., Martin M., Guiochon G.* Anal. Chem., **46**, 1640 (1974).
145. *Seiber J. N. J.* Chromatogr., **94**, 151 (1974).
146. *Ramsteiner K. A., Hörmann W. D. J.* Chromatogr., **104**, 438 (1975).
147. *Carolstrom A. A. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 1157 (1977).
148. *Compton B. J., Purdy W. C. J.* Chromatogr., **169**, 39 (1979).
149. *Sidwell J. A., Ruzicka J. H. A.* Analyst (London), **101**, 111 (1976).
150. *Farrington D. S., Hopkins R. G., Ruzicka J. H. A.* Analyst (London), **102**, 377 (1977).
151. *Lawrence J. F. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **59**, 1066 (1976).
152. *Byast T. H. J.* Chromatogr., **134**, 216 (1977).
153. *Spengler D., Hamroll B. J.* Chromatogr., **49**, 205 (1970).
154. *Hirschfeld T.* Anal. Chem., **52**, 297A (1980).
155. *Brooks C. J. W., Middleditch B. S.* — In: Mass Spectrometry, Vol. 5./Ed. Johnstone R. A. W. London: Chemical Society, 1979.
156. *Brooks C. J. W., Edmonds C. G., Gaskell S. J., Smith A. G.* Chem. Phys. Lipids, **21**, 403 (1978).
157. *Ten Noever de Brauw M. C. J.* Chromatogr., **156**, 207 (1979).
158. *McFadden W. H. J.* Chromatogr. Sci., **17**, 2 (1979).
159. *Millard B. J.* Quantitative Mass Spectrometry. London: Heyden, 1978, p. 171.
160. *Burlingame A. L., Baillie T. A., Derrick P. J., Chizhov O. S.* Anal. Chem., **52**, 220R (1980).
161. *Harless R. L., Harris D. E., Sovocool G. W., Zehr R. D., Wilson N. K., Oswald E. O.* Biomed. Mass Spectrom., **5**, 232 (1978).
162. *Onuska F. I., Comba M. E., Coburn J. A.* Anal. Chem., **52**, 2272 (1980).
163. *Bevenue A., Beckman H.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., **2**, 319 (1967).
164. *Dougherty R. C., Piotrowska K.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **73**, 1777 (1976).
165. *Carnmer M. F., Freal J.* Life Science, **9**, 121 (1970).
166. *Akisada T.* Bunseki Kugaku, **14**, 101 (1965).
167. *Dougherty R. C.* — In: Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology./Ed. Raol K. P. New York: Plenum, 1978, p. 351.
168. *Yang R. S., Coulston H. F., Goldberg L. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **58**, 1197 (1975).
169. *Kuehl D. W., Dougherty R. C.* Environ. Sci. Technol., **14**, 447 (1980).
170. *Ohe T.* Bull. Environ. Contem. Toxicol., **22**, 287 (1979).
171. *Homburger E., Reggiani G., Sambeth J., Wipf H. K.* Ann. Occup. Hyg., **22**, 327 (1979).

172. Lucier G. (Editor), *Environ. Health Perspect.*, **5** (1973).
173. Hummel R. A. J. *Agr. Food Chem.*, **25**, 1049 (1977).
174. Pfeiffer C. D. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 386 (1976).
175. Pfeiffer C. D., Nestruck T. J., Kocher C. W. *Anal. Chem.*, **50**, 800 (1978).
176. Shadoff L. A., Hummel R. A. *Biomed. Mass Spectrom.*, **5**, 7 (1978).
177. Mahle N. H., Higgins H. S., Getzandaner M. E. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 123 (1977).
178. Stehl R. H., Lamparski L. L. *Science*, **197**, 1008 (1977).
179. Lamparski L. L., Mahle N. H., Shadoff L. A. J. *Agr. Food Chem.*, **26**, 1113 (1978).
180. Langhorst M. L., Shadoff L. A. *Anal. Chem.*, **52**, 2037 (1980).
181. Lamparski L. L., Nestruck T. J. *Anal. Chem.*, **52**, 2045 (1980).
182. Chess E. K., Gross M. L. *Anal. Chem.*, **52**, 2057 (1980).
183. Buser H. R. *Anal. Chem.*, **49**, 918 (1977).
184. Nestruck T. J., Lamparski L. L., Stehl R. H. *Anal. Chem.*, **51**, 2273 (1978).
185. Hass J. R., Friesen M. D., Harvan D. J., Parker C. E. *Anal. Chem.*, **50**, 1474 (1978).
186. Lamparski L. L., Nestruck T. J., Stehl R. H. *Anal. Chem.*, **51**, 1453 (1979).
187. Mitchum R. K., Moler G. F., Korfmacher W. A. *Anal. Chem.*, **52**, 2278 (1980).
188. Cavallaro A., Bartolozzi G., Carreri D., Bandi G., Luciani L., Viata G., Giorni G., Invernizzi G. *Chemosphere*, **9**, 623 (1980).
189. Buser H. R., Rappe C. *Anal. Chem.*, **52**, 2257 (1980).
190. Harless R. L., Oswald E. O., Wilkinson M. K., Dupuy A. E., Jr., McDaniel D. D., Tal H. *Anal. Chem.*, **52**, 1239 (1980).
191. Shadoff L. A., Lamparski L. L., Davidson J. H. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 478 (1977).
192. Harless R. L., Oswald E. O. — In: *Dioxin, Toxicological and Chemical Aspects*,/Eds. Cattabini F., Cavallaro A., Galli G. New York: Spectrum Publications, 1978, p. 51.
193. Baughman R., Meselson M. *Advan. Chem. Ser.*, **120**, 92 (1973).
194. O'Keefe P. W., Meselson M. S., Baughman R. W. J. *Ass. Offic. Anal. Chem.*, **61**, 621 (1978).
195. Baughman R. W., Meselson M. S. *Environ. Health Perspect.*, **5**, 27 (1973).
196. Lamparski L. L., Nestruck T. J., Stehl R. H. *Anal. Chem.*, in press.
197. Nestruck T. J., Lamparski L. L., Townsend D. I. *Anal. Chem.*, **52**, 1865 (1980).
198. Zweig G., Sherma J. *Anal. Chem.*, **52**, 276R (1980).
199. Halpaap H., Ripphahn J. *Chromatographia*, **10**, 613 (1977).
200. Ilinov P. P. *Lipids*, **14**, 598 (1979).
201. Sherma J., Miller N. T. J. *Liquid Chromatogr.*, **3**, 901 (1980).
202. Jork H., Roth B. J. *Chromatogr.*, **144**, 39 (1977).
203. *Fishbein L. Nitrosamines in Pesticides and Agricultural Residues*, Proc. Toxicol. Forum. DC, Washington: Toxicology Forum Assoc., 1980.
204. Oliver J. E. *Chem. Tech.*, **9**, 366 (1979).
205. Day E. W., Jr., West S. D., Koenig D. K., Powers F. L. J. *Agr. Food Chem.*, **27**, 1081 (1979).
206. West S. D., Day S. N., Jr. J. *Agr. Food Chem.*, **27**, 1075 (1979).
207. Fanelli R., Chiabrando C., Airoidi L. *Anal. Lett.*, **A11**, 845 (1978).
208. Preussman A., Walker E. A., Wasserman A. E., Castegnaro M. (Editors), *Environmental Carcinogens. Selected Methods of Analysis*, Vol. 1, Nitrosamines, IARC Scient. Publ. No. 18. Lyon: Intern. Agency Res. Cancer, 1978.
209. Gough T. A. *Analyst (London)*, **103**, 785 (1978).
210. Fine D. H., Rife F., Gunther B. *Anal. Lett.*, **6**, 731 (1973).
211. Fine D. H., Rife F., Lieb D., Rounbehler D. *Anal. Chem.*, **47**, 1188 (1975).

212. *Oettinger P. E., Huffman F., Fine D. H., Lieb D.* Anal. Lett., **8**, 411 (1975).
213. *Krull I. S., Mills K., Hoffmann G., Fine D. H.* J. Anal. Toxicol., **4**, 260 (1980).
214. *Krull I. S., Goff E. U., Hoffman G. G., Fine D. H.* Anal Chem., **51**, 1706 (1979).
215. *Castegnaro M., Walker E. A.* — In: Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds. IARC Scient. Publ. No. 79./Eds. Walker E. A., Castegnaro M., Griucite L., Lyle R. E. Lyon: Intern. Agency Res. Cancer., 1978, p. 53.

Глава 14

Неорганические соединения

М. Ледерер

14.1. Введение

Целью этой главы является рассмотрение перспектив развития современной хроматографии неорганических соединений. Изложенный здесь материал нельзя оценивать как исчерпывающий, поскольку в наши задачи не входило дублировать множество недавно опубликованных монографий, посвященных различным областям неорганической химии, тем более в пределах одной главы, объем которой ограничен. Мы обсудим методы как хроматографии, так и электрофореза неорганических соединений, так как часто только их совместное использование позволяет получить наиболее полную информацию о составе образца.

Хроматография неорганических соединений развивается по следующим двум основным направлениям: а) выделение и (или) определение элементов и б) разделение и определение ионных и молекулярных соединений в растворе.

С хроматографическими методами выделения и (или) определения неорганических соединений (именно неорганических — в хроматографии органических соединений дело обстоит иначе) конкурирует большое число других методов, включая полярографию, спектроскопию (в том числе атомно-абсорбционную) и радиоактивационный анализ. Хотя многие методы хроматографии были разработаны раньше, лишь очень немногим из них удалось «выжить» в условиях конкуренции с другими методами, и то главным образом благодаря их относительно низкой стоимости и удобству при проведении большого числа анализов.

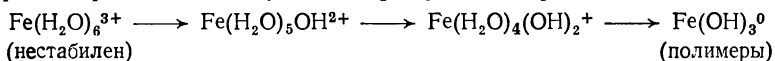
Успехи хроматографии в области разделения и определения ионных и молекулярных соединений в растворе значительно способствовали прогрессу в химических исследованиях неорганических соединений. Некоторые области химии, например химия полифосфатов, соединений астатина и химия растворов металлов платиновой группы, развились почти исключительно благодаря применению методов хроматографии*.

* Приведем некоторые опубликованные на русском языке книги, в которых рассматривается определение неорганических соединений хроматографическими методами.

14.2. Равновесие комплексообразования

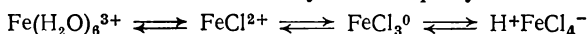
Основные принципы химии растворов обычно базируются на элементарной электрохимии, и это создает у большинства химиков впечатление, что при обычных концентрациях, характерных для «мокрых методов анализа», ионы находятся чаще всего в «свободном» состоянии. Так, например, о «ионной подвижности» ионов « Fe^{3+} », определяемой по результатам измерений электропроводности при бесконечном разбавлении, говорится даже в учебниках электрохимии. Поэтому при рассмотрении химии растворов ионов металлов возьмем в качестве примера раствор, содержащий ионы Fe^{3+} .

а. Если розовый гидрат нитрата железа(III) растворить в дистиллированной воде, то получится бледно-коричневый раствор, содержащий следующие продукты гидролиза:



В свежих растворах преобладает $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}^{2+}$. Возможно также образование димеров, связанных ОН-мостиками. Состав продуктов гидролиза меняется в зависимости от температуры, концентрации и длительности хранения раствора. Эти реакции не полностью обратимы, и использование старых растворов или растворов старых образцов исходных соединений приводит к появлению ряда зон в различных хроматографических системах.

б. Если розовый нитрат железа(III) растворить в HCl , то образуется раствор с окраской от желтого до коричневого цвета, содержащий в основном следующие продукты:



В приблизительно 6 М растворе HCl преобладают нейтральные частицы и анионные группировки ($\text{H}^+\text{FeCl}_4^-$ представляет собой, вероятно, весьма стабильную ионную пару). Fe^{3+} , т. е. ион $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, не обнаруживается ни в одном из растворов.

В качестве примера хроматографического разделения неорганических ионов рассмотрим разделение $\text{Ni}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. В раство-

Вольнец М. П. Тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. — М.: Наука, 1974.

Римен В., Уолтон Г. Ионообменная хроматография в аналитической химии. — М.: Мир, 1973.

Сенявин М. М. Ионный обмен в технологии и анализе неорганических веществ. — М.: Химия, 1980.

Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. — М.: Мир, 1984.

Шведт Г. Хроматографические методы в неорганическом анализе. — М.: Мир, 1984.

Уильямс У. Дж. Определение анионов. — М.: Химия, 1982. — *Прим. ред.*

рах HCl с концентрациями до 12 М ион Ni^{2+} не образует каких-либо комплексов, кроме, пожалуй, NiCl^+ . В то же время Fe^{3+} в растворах HCl с концентрациями 6 М и выше находится в виде очень «гидрофобной» ионной пары $\text{H}^+\text{FeCl}_4^-$, которая ведет себя как анион. Таким образом, при концентрациях HCl свыше 6 М эти два металла можно разделить фактически лю-

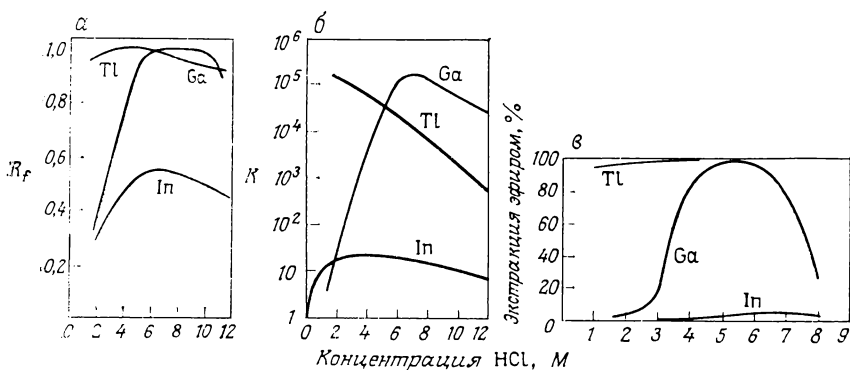


Рис. 14.1. Зависимости характеристик удерживания Tl^{3+} , In^{3+} и Ga^{3+} от концентрации HCl [64] (с разрешения автора).

а — R_f в n -бутаноле; б — K для ионообменной хроматографии на дауэксе 1; в — экстракция диэтиловым эфиром в распределительной хроматографии для системы эфир — вода.

быми хроматографическими методами. Перечислим некоторые из них:

а. Экстракция из раствора диэтиловым эфиром: Ni^{2+} не экстрагируется, а Fe^{3+} экстрагируется на 99%.

б. Анионообменная хроматография на колонке с дауэксом 1 с элюированием 8 М HCl : Fe^{3+} адсорбируется в виде коричневой полосы, Ni^{2+} элюируется.

в. Распределительная бумажная хроматография в системе n -бутанол — 8 М HCl (1 : 1): для Ni^{2+} $R_f = 0,36$, для Fe^{3+} $R_f = 0,98$; гидрофобное соединение $\text{H}^+\text{FeCl}_4^-$ хорошо экстрагируется бутанолом.

На рис. 14.1 показано разделение трех ионов In^{3+} , Ga^{3+} и Tl^{3+} . Конечно, Tl^{3+} и In^{3+} можно разделить методом распределительной или ионообменной хроматографии или даже экстракцией в широком диапазоне концентраций HCl , однако Ga^{3+} можно отделить от In^{3+} только в растворе HCl с концентрацией выше 2—3 М, а от Tl^{3+} только в растворе HCl с концентрацией ниже 5 М.

Хроматографические характеристики ионов большинства металлов (и многих других ионов) обычно представляют в виде периодической таблицы. Как следует из данных, полученных

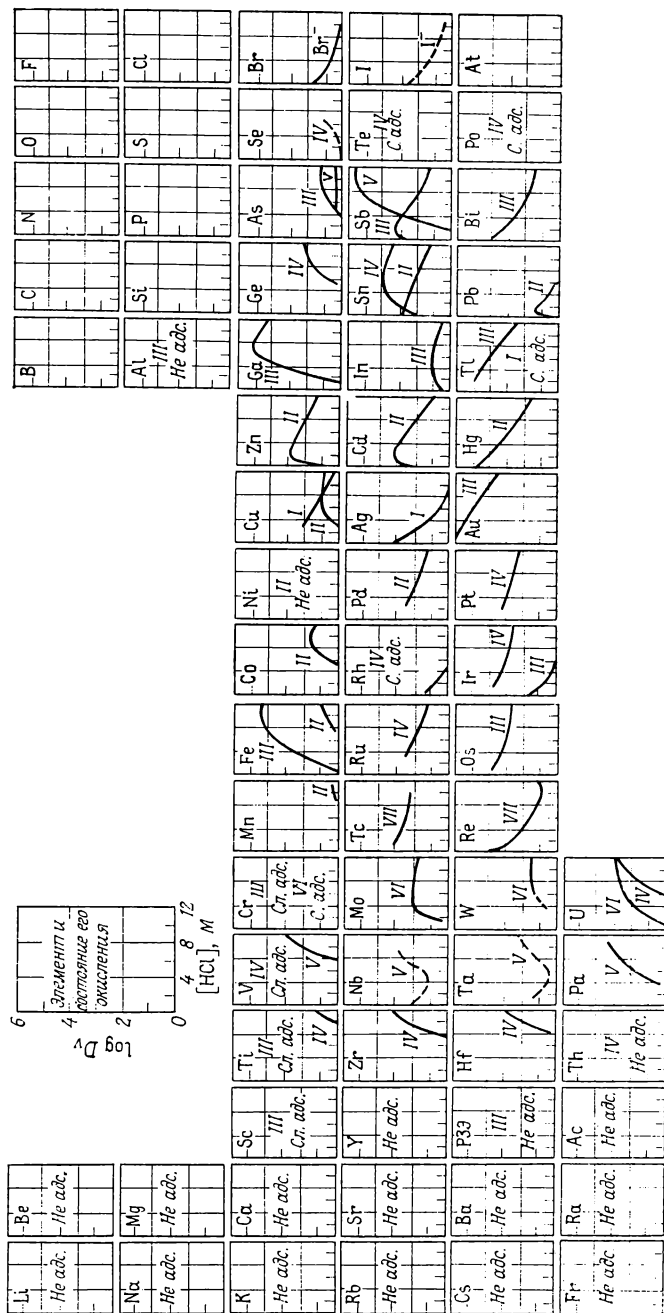


Рис. 14.2. Ионнообменная хроматография на дауэксе 1 с использованием HCl при коэффициенте распределения $D_0 \gg 1$ [65] (с разрешения автора).

Не адс. — не адсорбируется в 0,1–12 М HCl; с. адс. — слабо адсорбируется в 12 М HCl; с. адс. — сильно адсорбируется.

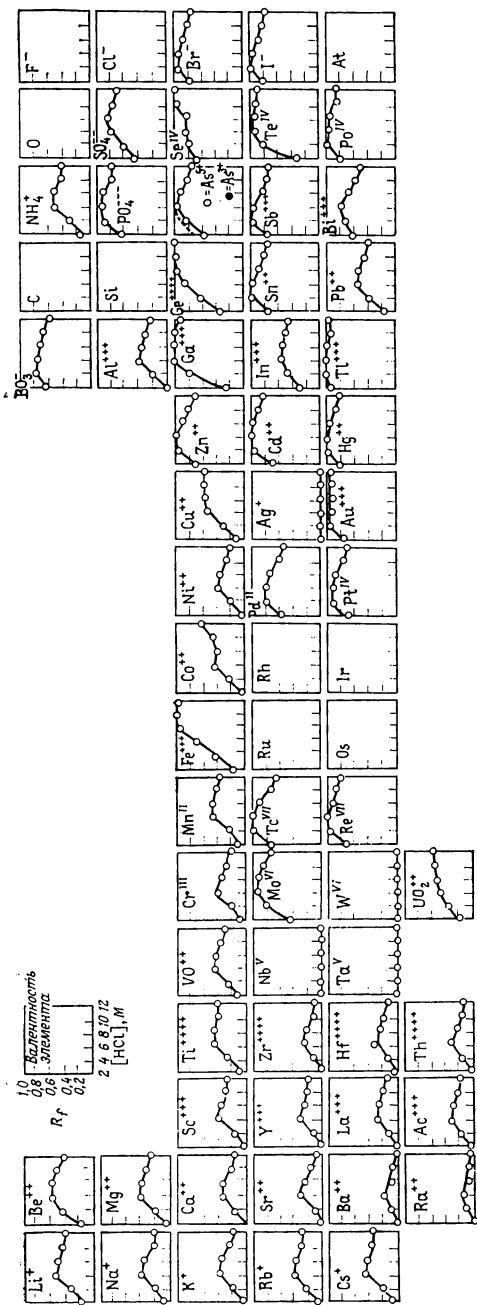


Рис. 143. Величины R_f ионов в смеси бутанола — HCl [66] (с разрешения автора).

Все растворы приготовлены путем смешения равных объемов водного раствора кислот и бутанола; с 2 M HCl образуется только одна фаза.

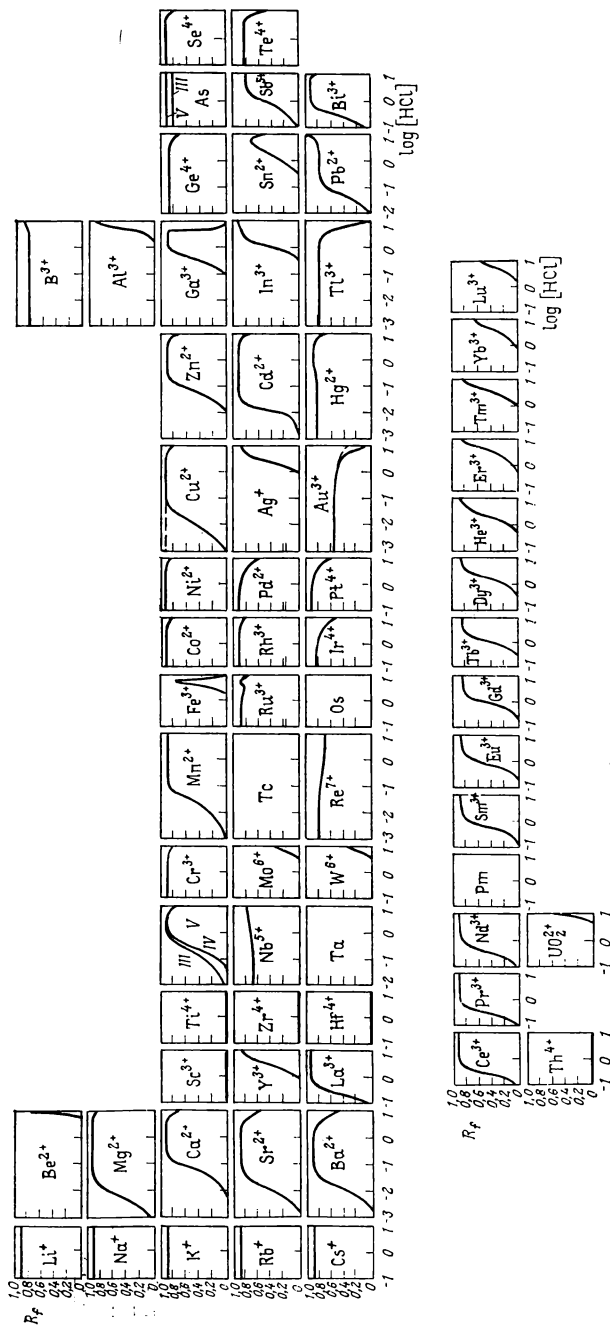


Рис. 14.4. Хроматография на бумаге, обработанной 0,1 М раствором ди-(2-этилгексил)ортофосфорной кислоты в циклогексане [67] (с разрешения автора).

для нескольких различных систем (рис. 14.2—14.5), разделение в большей степени зависит от концентрации HCl в водных растворах, чем от выбора хроматографической системы. На указанных рисунках хорошо прослеживается важная характерная особенность хроматографии неорганических соединений: мно-

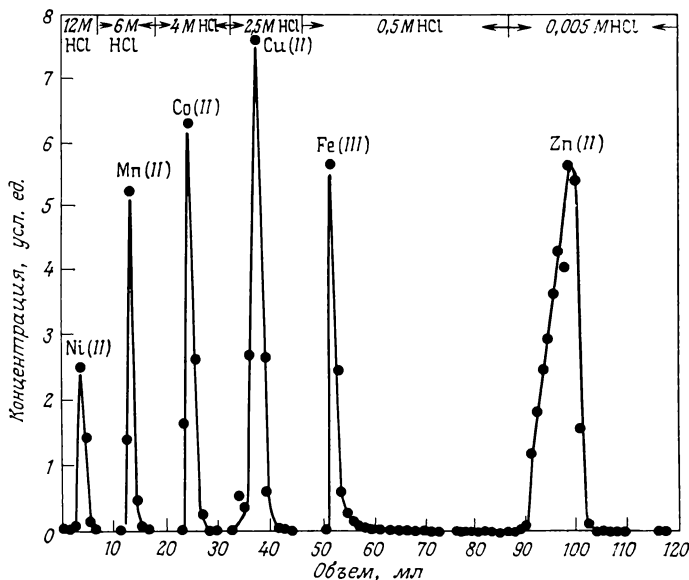


Рис. 14.6. Разделение переходных элементов от Mn до Zn с помощью ионообменной хроматографии [69] (с разрешения автора).

Колонка: 26 см \times 0,29 см² с дауэксом 1; скорость потока: 0,5 см/мин.

гочисленные металлы образуют с HCl комплексы при различных концентрациях HCl . Это позволяет изменять коэффициенты разделения в широких пределах и селективно элюировать металлы путем соответственного изменения концентрации HCl (рис. 14.6). При таком разделении нет никакой необходимости в применении хроматографической системы с большим числом теоретических тарелок. В большинстве работ по анионообменной хроматографии колонками служили 10-миллилитровые пипетки, в нижнюю часть которых помещали пробку из стекловолокна, удерживающую слой смолы. Поскольку большинство галогенидных комплексов ионов металлов (например, ионов Co , Cu , Fe) окрашены в разные цвета, зачастую не требуется никакого сборника фракций, так как каждую фракцию можно собрать в отдельный приемник. В то же время, используя эффективную колонку и (в данном случае) HCl необходимой концентрации, а также правильно выбранный органический рас-

творитель, можно примерно за 30 мин элюировать дюжину тяжелых металлов, как это показано, например, на рис. 14.7.

В заключение отметим, что комплексы металлов, особенно тяжелых, разделяют методом ионообменной хроматографии на катионо- и анионообменниках, жидких ионообменниках, нанесенных на целлюлозу или полимерные носители, или методом распределительной и обращенно-фазовой хроматографии (на-

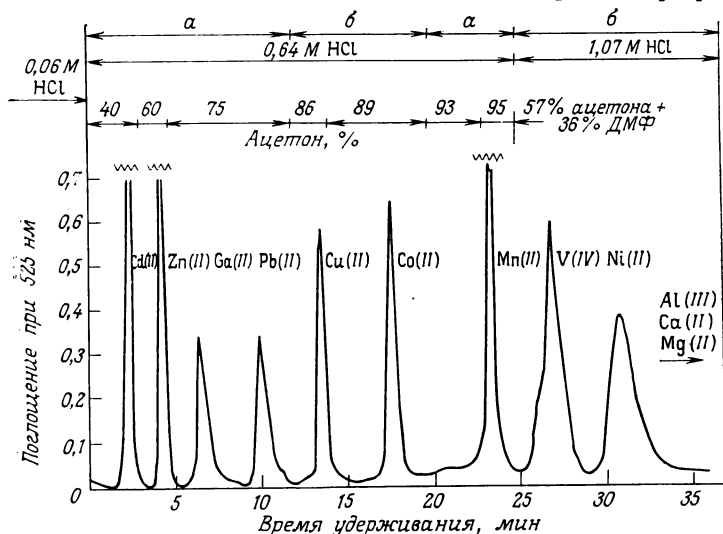


Рис. 14.7. Разделение ионов металлов на амберлите 200 (25—30 мкм) [70] (с разрешения автора).

Колонка: 120×5 мм; скорость потока: 22 см/мин; температура: 40 °С; давление на входе в колонку: 16—25 атм; окрашивающий реагент: 0,02%-ный раствор 4-(2-пиридилазо)резорцина в 0,7 М (а) и 1,2 М (б) растворе аммиака; объем образца: 60 мл. Содержание металлов, 10⁻⁸ моль: 9,6 Cd²⁺, 4,8 Zn²⁺, 4,5 Ga³⁺, 12 Pb²⁺, 4,8 Cu²⁺, 7,2 Co²⁺, 12 Mn²⁺, 57 V⁴⁺, 12 Ni²⁺, 9,6 Al³⁺, 1,2·10³ Ca²⁺, 6·10² Mg²⁺.

пример, на ацетилцеллюлозе), а также методом бумажного электрофореза. В статьях [1, 2] обобщены данные по плоскостным методам разделения, и каждому специалисту, начинающему работать в указанной области, следует прежде всего ознакомиться с этим материалом.

14.3. Медленно устанавливающиеся равновесия комплексообразования

Анализируя данные, приведенные на рис. 14.2—14.5, можно решить, что задача разделения любой смеси ионов металлов сводится к выбору оптимальных условий (при использовании которых процессы образования комплексов протекают по-раз-

ному) и такого метода, который позволил бы провести разделение в выбранных условиях.

Однако ионы ряда металлов, например Rh^{3+} , Ru^{3+} и Cr^{3+} , вступают в реакцию комплексообразования настолько медленно, что изменение концентрации, при которой образуются комплексы, приводит к возникновению смеси комплексов. Так, например, RhCl_6^{3-} в водном растворе HCl сначала быстро гидро-

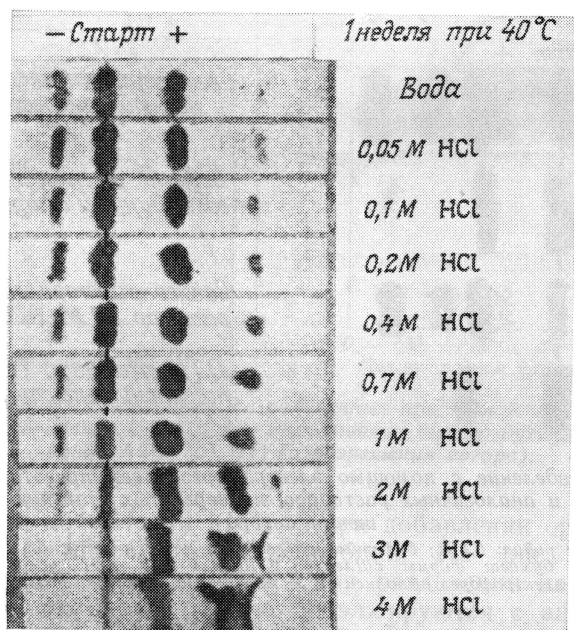


Рис. 14.8. Зависимость степени гидролиза родия от концентрации HCl [3] (с разрешения автора).

Хлорокомплексы родия: 0,1 н.; буферный раствор: смесь 0,3 н. уксусной кислоты и 0,2 н. ацетата натрия; бумага: фирмы «Шлейхер и Шюлл» 2043 Впг1; условия разделения: электрофорез выполнен за 30 мин при напряжении 3 кВ.

лизуется до $\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_5^{2-}$, а затем более медленно образует смесь хлоро- и аквакомплексов, как это наглядно демонстрируют рис. 14.8 и 14.9. Поэтому ионы таких металлов образуют во всех хроматографических системах не одну, а несколько зон.

Хотя многие авторы практикуют составление «периодических таблиц» хроматографических характеристик ионов таких металлов, приведенные в этих таблицах данные обычно относятся только к доминирующим соединениям и «прямое» использование таких хроматографических характеристик на практике часто может привести к ошибочным результатам. Особое

внимание следует обратить на Ru^{3+} , который образует исключительно стабильные нитрозил-, а также нитро- и нитратокомплексы. Раствор рутения в HNO_3 всегда представляет собой смесь таких комплексов (иногда содержащей также полимеры), состав которой постепенно меняется, что значительно усложняет анализ. Осуществить разделение таких смесей и выделить индивидуальные соединения, а также рассчитать константы устойчивости комплексов впервые удалось лишь бла-

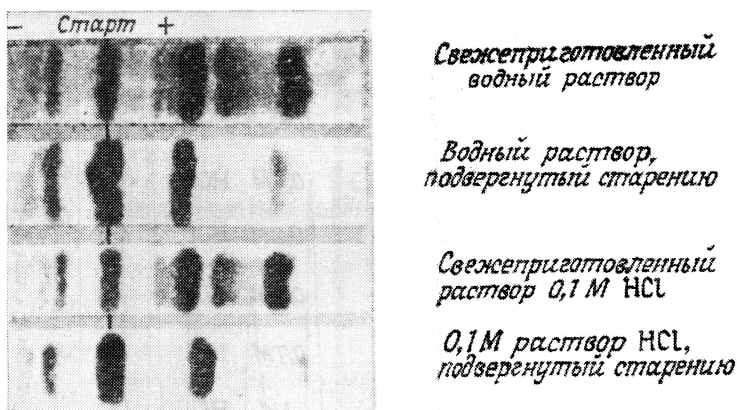


Рис. 14.9. Разделение с помощью электрофореза свежеприготовленных растворов родия и аналогичных растворов, подвергнутых старению [3] (с разрешения автора).

Хлорокомплексы родия: 0,1 н.; буферный раствор: смесь 0,3 н. уксусной кислоты и 0,2 н. ацетата натрия; бумага: фирмы «Шлейхер и Шюлл» 2043 bmgI; условия разделения: электрофорез выполнен за 30 мин при напряжении 3 кВ.

годаря хроматографии и электрофорезу. В прекрасном обзоре Блазиуса и Притца [3] показано, какие перспективы открывает применение методов хроматографии и электрофореза в этой области.

14.4. Гидрофобная адсорбция и «эффект перхлората»

В тех случаях, когда хроматографическое разделение проводится в растворах HCl на анионообменных смолах, ряд хлорокомплексов ионов металлов, особенно комплексы металлов последнего ряда периодической таблицы, а именно Au^{3+} , Hg^{2+} , Po^{4+} , а также Sb^{5+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} , характеризуется исключительно высокими значениями K_d (порядка 10^6). При разделении с помощью метода распределительной хроматографии с применением смеси бутанол — HCl они также движутся вблизи фрон-

та растворителя и весьма сильно адсорбируются на нейтральных и сульфированных смолах, а некоторые из них адсорбируются из HCl даже на целлюлозной бумаге. Очевидно, что это объясняется не «ионным взаимодействием» между анионом типа AuCl_4^- и ионизованной аммониевой группой смолы, а гидрофобной адсорбцией. На нейтральных носителях повышенная адсорбция этих комплексов наблюдается при их высаливании

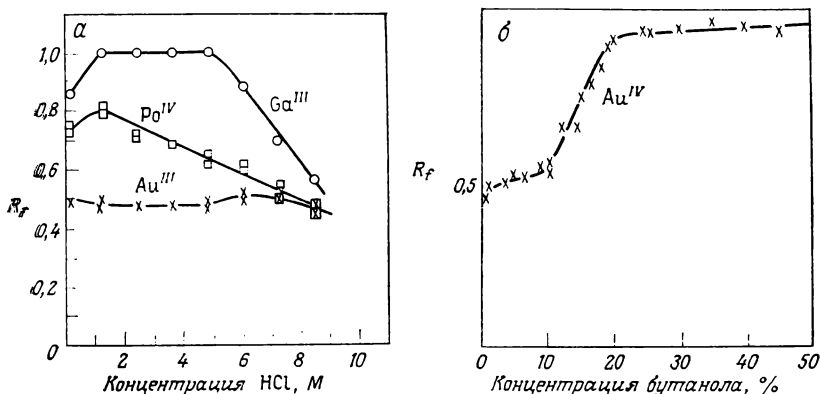


Рис. 14.10. Зависимость величин R_f , полученных при элюировании Ga^{3+} , Po^{4+} и Au^{3+} соляной кислотой (а) и при элюировании смесью бутанол — 6 М HCl ионов Au^{3+} (б) [71] (с разрешения автора).

(обычно при добавлении LiCl), а при добавлении органических растворителей происходит их десорбция. На рис. 14.10, а и б показаны результаты, типичные для разделения на целлюлозной бумаге. Эти ионы обычно не элюируются с анионообменных смол растворами HCl любой концентрации, но под воздействием HClO_4 происходит их быстрая десорбция, т. е. наблюдается так называемый «эффект перхлората». Позднее выяснилось, что такое же влияние оказывают и нитраты, а также другие богатые кислородом анионы и что, вероятнее всего, это явление связано с конкуренцией гидрофобных анионов за центры адсорбции.

Таблица 14.1. Величины R_f цис-дигалогендиамминплатины(II) [71] (растворитель: вода, бумага: ватман № 3ММ; температура: 5 °C)

Комплекс	R_f	Комплекс	R_f
$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$	0,65	$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClI}$	0,56
$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClBr}$	0,58	$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2$	0,44
$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Br}_2$	0,53		

Разделение многочисленных нейтральных координационных комплексов также происходит благодаря адсорбции, имеющей гидрофобный характер. В табл. 14.1 приведены величины R_f *цис*-дигалогендиамминплатины(II). Очевидно, что по мере увеличения радиуса иона галогена значение R_f уменьшается.

14.5. Образование ионных пар или комплексов, имеющих внешнюю координационную сферу

Ионы металлов, у которых первая координационная сфера полностью заполнена, могут образовывать и вторую (внешнюю) координационную сферу. Это явление впервые было открыто Вернером, который заметил, что цвет и (спектр) очень стабильного аниона $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ изменяется в присутствии суль-

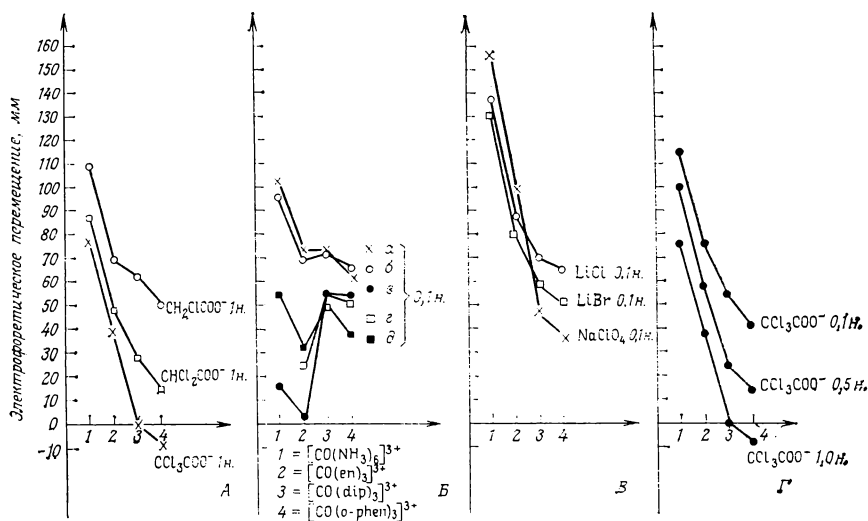


Рис. 14.11. Кривая перемещения комплексов $\text{Co}(\text{III})$ при электрофорезе в различных электролитах [72].

А — моно-, ди- и трихлорацетат (1 н.); Б — двухзарядные анионы: сукцинат- (а), малонат- (б), сульфат- (в), оксалат- (г) и калиймонофталат- (д); В — LiCl , LiBr и NaClO_4 ; Г — 0,1, 0,5 и 1 н. растворы трихлорацетата. Комплексы: 1 — гексамминкобальт(III), 2 — трис(этилендиаммин)кобальт(III), 3 — трис(дипиридил)кобальт(III), 4 — трис(о-фенантролин)кобальт(III).

фат-ионов. В различных системах, используемых для разделения, влияние внешней сферы наиболее заметно при проведении бумажного электрофореза комплексов $\text{Co}(\text{III})$, что хорошо видно на рис. 14.11.

Хлориды и другие однозарядные гидратированные анионы, например ацетаты и нитраты, образуют неспецифичное «анионное облако», которое в значительной, но примерно одинаковой степени увеличивает удерживание всех комплексов. Сульфат, хромат и большинство двухзарядных анионов связываются водородными мостиками с координируемыми группами NH_3 или H_2O ; причем влияние образования этих связей может быть настолько сильным, что ионы (даже трехзарядные) ведут себя в растворе как нейтральные соединения. Однако с дипиридиллом или *o*-фенантролином и с другими соединениями или группами, неспособными к образованию водородных связей, эти ионы комплексов не дают. В то же время гидрофобные анионы, например перхлорат или трихлорацетат, образуют «гидрофобные ионные пары», в первую очередь с объемными гидрофобными координируемыми группами типа дипиридила или *o*-фенантролина. И в данном случае этот эффект может проявляться весьма отчетливо. Установлено, что сульфогруппы смолы взаимодействуют с аква- или аминогруппами комплекса, что приводит к формированию внешней сферы. Необходимо подчеркнуть, что при этом происходит также образование внутренних комплексов. Имеются также данные о том, что образование комплексов с внешней сферой, например между алюминатными группами на поверхности оксида алюминия или силанольными группами на поверхности силикагеля, с одной стороны, и координационными комплексами — с другой, оказывает определенное влияние на хроматографическое разделение последних на неорганических ионообменниках.

14.6. Ионная хроматография

Поразительные успехи в аналитической ионообменной хроматографии были достигнуты в последнее время Смоллом и др. [4]. Ввиду того что в ионообменной хроматографии элюентом обычно служит сильный электролит, непрерывный контроль за составом элюата путем измерения его электропроводности практически невозможен, за исключением отдельных случаев. В выпускаемом фирмой Dionex Corp. ионном хроматографе (Ion Chromatograph) анионы элюируются солями слабых кислот. При пропускании элюента через катионообменник в водородной форме («колонку подавления», или «колонку вычитания») все катионы удаляются, в элюенте остается только слабая кислота.

После проведения этой операции зоны сильных электролитов можно регистрировать по их электропроводности. Типичными элюентами, используемыми в ионной хроматографии, яв-

ляются, например, карбонат-бикарбонатные смеси. Поскольку применяемые смолы имеют малую емкость (0,007 мэкв./г), концентрация электролита в элюенте может быть весьма малой ($2 \cdot 10^{-4}$ М). Гьерд и др. [5] провели большую работу по разделению значительного числа разнообразных анионов. Результа-

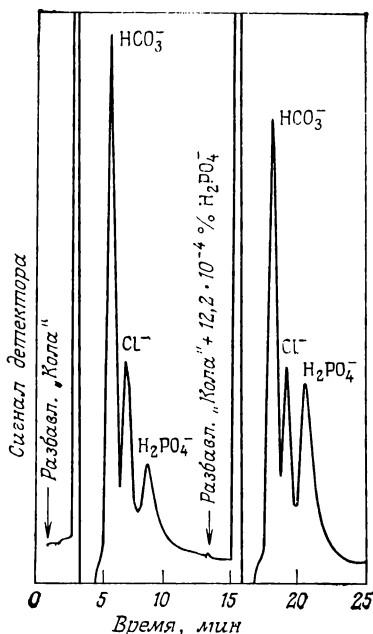


Рис. 14.12. Отделение фосфатов от всех других анионов в разбавленном напитке «Кола» посредством ионной хроматографии с применением 10^{-4} М раствора бензоата калия при pH 6,25 на колонке со смолой ХАД-2 (0,007 мэкв./г) [5] (с разрешения автора).

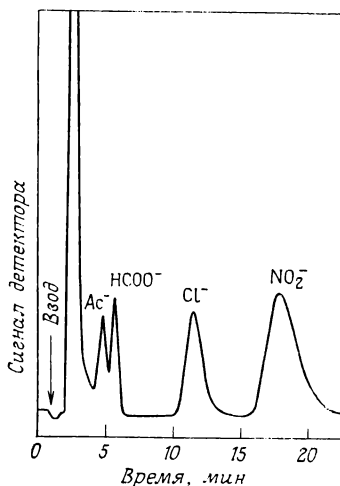


Рис. 14.13. Ионная хроматография раствора смеси ацетат-, формиат-, хлорид- и нитрит-ионов [5] (с разрешения автора).

Анионообменник: смола видак SC; элюент: $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор бензоата калия при pH 6,25; концентрация анионов, $10^{-4}\%$: 27,1 ацетат-ионы; 6,8 формиат-ионы; 5,1 хлорид-ионы; 15,8 нитрит-ионы.

ты прекрасно выполненных ими разделений представлены на рис. 14.12—14.14. Как следует из приведенных хроматограмм, для одного разделения требуется всего 10 мин. Таким образом, ионная хроматография может с успехом конкурировать с методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В принципе разделение ионов металлов можно также проводить на смолах с низкой емкостью. Однако чтобы осуществить такое разделение, Гьерду и Фритцу [6] понадобились прибор, изготовленный целиком из стекла и пластмассы, и спектрофо-

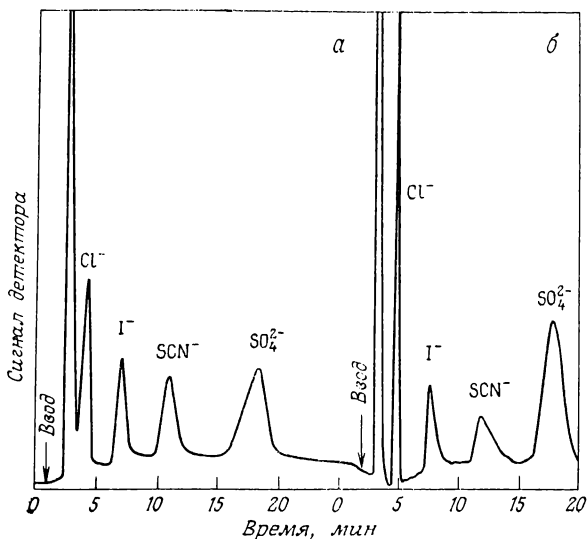


Рис. 14.14. Ионная хроматография раствора смеси хлорид-, иодид-, тиоцианат- и сульфат-ионов (а) и аналогичного раствора, разбавленного в 10 раз (б) [5] (с разрешения автора).

Анионообменник: смола ХАД-1 (0,007 экв./г); элюент: $5 \cdot 10^{-5}$ М раствор фталата калия, рН 6,25; концентрация анионов, $10^{-4}\%$: 7,7 Cl^- ; 29,5 I^- ; 28,5 SCN^- ; 16,5 SO_4^{2-} .

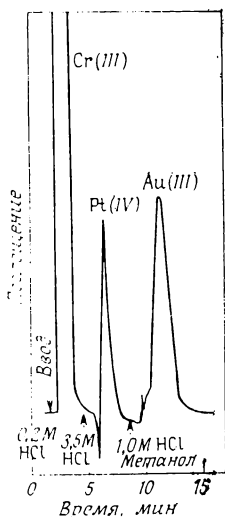


Рис. 14.15. Ионная хроматография хрома, платины и золота [6] (с разрешения автора).

Ионообменник: смола ХАД-4 (0,21 экв./г); элюенты: указаны на рисунке; обнаружение: по поглощению при 225 нм. Содержание металлов, мкг: $2,0 \cdot 10^3$ Cr(III) , 39 Pt(IV) , 7,8 Au(III) .

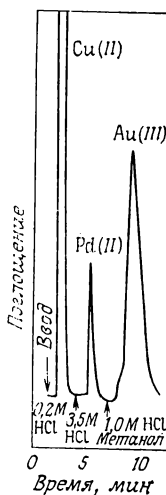


Рис. 14.16. Ионная хроматография меди, палладия и золота [6] (с разрешения автора).

Условия разделения указаны в подписи к рис. 14.15. Содержание металлов, мг: $1,3 \cdot 10^3$ Cu(II) , 2,1 Pd(II) и 9,8 Au(III) .

тометрический детектор. Две из полученных ими хроматограмм показаны на рис. 14.15 и 14.16. Разделение этих двух смесей удалось осуществить всего за 10—15 мин.

14.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Хроматографическая аппаратура, имеющаяся в настоящее время в продаже, малопригодна для разделения ионов металлов. Если предполагаемые элюенты содержат хлорид-ионы,

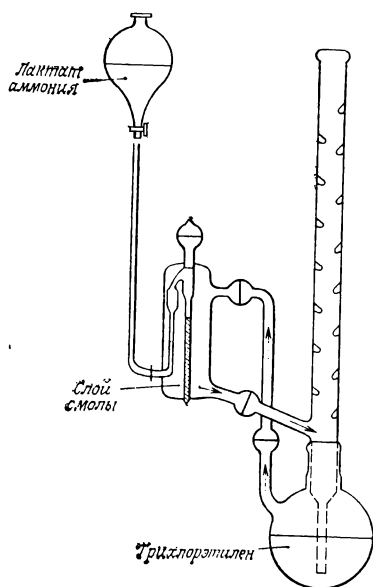


Рис. 14.17. Прибор для разделения редкоземельных металлов при помощи ионообменной хроматографии с использованием лактата [8] (с разрешения автора).

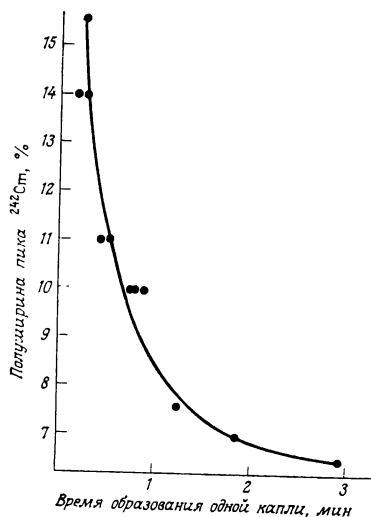


Рис. 14.18. Зависимость ширины пиков, получаемых при разделении редкоземельных металлов при помощи ионообменной хроматографии, от скорости поступления каплей лактата аммония [8] (с разрешения автора).

особенно в кислых растворах, колонки из нержавеющей стали применять нельзя. Поскольку различные соединения в хроматографе и детектор обычно изготавливают именно из нержавеющей стали или других металлов, выбор элюентов чрезвычайно ограничен. Результаты многочисленных вначале попыток применить ВЭЖХ для разделения хелатов металлов были бо-

лее чем скромными: эти методы либо оказались вообще непригодными для решения конкретных аналитических проблем, либо не имели никаких преимуществ перед уже применявшимися ранее. Большинство таких методов рассмотрено в обзоре [7].

В то же время быстрый метод разделения позволил бы решить очень важную задачу — осуществить разделение радио-

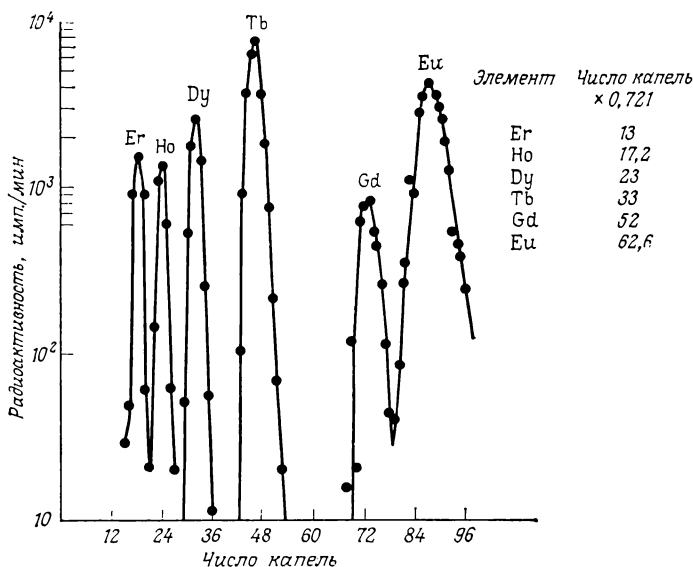


Рис. 14,19. Элюирование лантаноидов раствором лактата аммония на колонке с дауэксом 50 (~1 капля в 2 мин, объем капли 35 мкл) [8] (с разрешения автора).

активных изотопов, в первую очередь изотопов с малым периодом полураспада. Еще примерно лет за десять до появления ВЭЖХ (см. предисловие) в фундаментальном труде по трансурановым элементам [8] был описан метод, который можно считать предшественником ВЭЖХ. На рис. 14.17 показана приведенная в работе [8] схема прибора, в который входила короткая колонка диаметром 2 мм, наполненная мелкими частицами смолы. Более того, как следует из рис. 14.18, Томсон и его коллеги [8] уже тогда рассматривали эффективность колонок (число теоретических тарелок) при различных скоростях потока. Разделение в указанных условиях осуществлялось примерно за 200 мин (расход элюента составлял 100 капель, одна капля в 2 мин), но разделение Er и Ho было завершено уже за

30 мин (рис. 14.19), что соответствует продолжительности некоторых разделений методами современной ВЭЖХ.

Для того чтобы провести разделение радиоактивных изотопов методом ВЭЖХ, авторы работы [9] разработали специальный прибор, в котором все детали, контактирующие с раство-

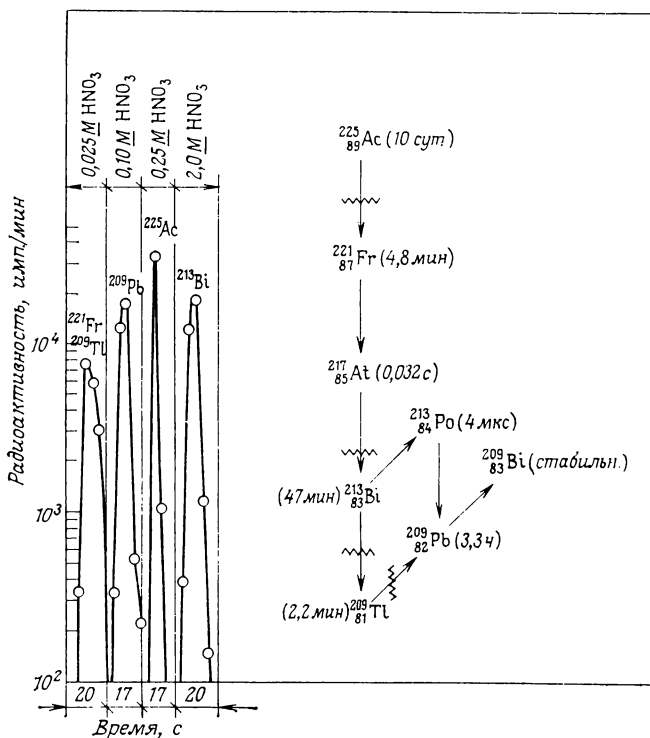


Рис. 14.20. Высокоскоростное разделение ^{225}Ac и дочерних ядер [9] (с разрешения автора).

Колонка: 10×2 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза: 30%-ная (по массе) ди-(2-этилгексил)ортофосфорная кислота в додекане, нанесенная на зорбак-SIL (5 мкм); элюент: HNO_3 ; скорость потока: 17 см/мин, температура, $^{\circ}\text{C}$: 50.

рителем, выполнены только из стекла или тефлона. Неподвижная фаза представляет собой 25—30%-ный раствор ди-(2-этилгексил)ортофосфорной кислоты в додекане, нанесенный на сферические микрочастицы пористого силикагеля. Максимальное давление, при котором работают колонки высотой всего 1 см, может достигать 35,2 атм. На рис. 14.20 показана типичная картина разделения ^{225}Ac и его дочерних изотопов, на которое потребовалось всего 74 с. Авторы этой работы сообщили также об обогащении изотопов $^{48}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, проведенном на колонке

длиной 75 см ($\sim 30\,000$ теоретических тарелок) при температуре 9°C , что является значительным прогрессом по сравнению с предыдущими работами, проводимыми методами «медленной хроматографии».

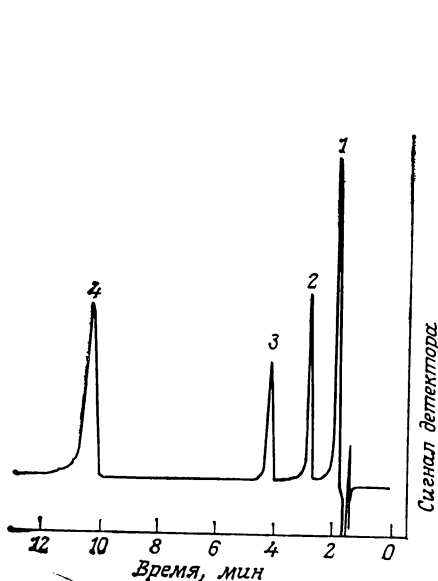


Рис. 14.21. Разделение галогенидов при помощи ВЭЖХ [10] (с разрешения автора).

Колонка: $250 \times 4,6$ мм; неподвижная фаза: Sil 50DI10CN; элюент: водно-метанольный (3:2) раствор $0,1$ М по Na_2HPO_4 , $0,1$ М по KH_2PO_4 и $9,1\%$ -ный (масса/объем) по бромиду цетилтриметиламмония; скорость потока: 2 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 210 – 220 нм. Пики: 1 — иодат, 2 — бромат, 3 — бромид, 4 — иодид.

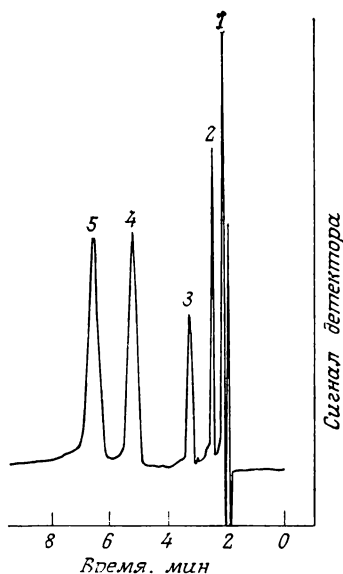


Рис. 14.22. Разделение иодидов и полииодатов при помощи ВЭЖХ [10] (с разрешения автора).

Элюент: метанол — вода (11:9). Другие условия разделения см. в подписи к рис. 14.21. Пики: 1 — тиосульфат, 2 — иодид, 3 — тритионат, 4 — тетраионат, 5 — пентаионат.

Имеющаяся в продаже аппаратура для ВЭЖХ вполне пригодна для разделения анионов, но малоприспособлена для разделения ионов металлов. Рив [10] успешно разделял анионы на колонке, содержащей модифицированный силикагель с привитыми цианогруппами. На рис. 14.21 и 14.22 показаны типичные хроматограммы, полученные этим автором (см. также разд. 14.13).

14.8. Гель-хроматография

В элементарных учебниках химии образование нерастворимых гидроксидов, например $\text{Fe}(\text{OH})_3$, описывается как реакция, подчиняющаяся закону действующих масс (произведение

растворимости), хотя уже около 50 лет назад в процессе работы с мечеными коллоидами стало ясно, что это представление неверно. В зависимости от концентрации ионов металла, скорости добавления OH^- -ионов, температуры и других факторов может образоваться целый ряд нестабильных и стабильных растворимых и коллоидных полимеров. Лишь очень немногие из этих возникающих при гидролизе полимеров охарактеризованы достаточно полно, к их числу относится полимер, образуемый цирконием(IV) в разбавленной HCl . Как установлено, молекулярная масса полианиона этого полимера равна примерно 20 000. Это, пожалуй, первое полимерное соединение, которое удалось выделить при помощи «гель-фильтрации», т. е. элюированием из ионообменной сульфированной смолы [11] (если бы это соединение было мономерным, то, обладая большим зарядом, оно бы прочно удерживалось).

Гель-хроматография, как представляется на первый взгляд, должна быть идеальным методом отделения полимеров и определения их характеристик. Однако большинство известных сорбентов, применяемых в гель-хроматографии, для решения этой задачи не подходят. На поверхности гелей сефадекса имеются вицинальные гидроксильные группы, которые в нейтральной среде легко образуют комплексы с ионами большинства металлов (типичным соединением этого типа является «глицерат железа» Британской фармакопеи). Поэтому при применении в больших концентрациях эти ионы дают «хвосты», а при малых концентрациях полностью адсорбируются. На поверхности пористых стекол и пористого силикагеля (и их производных) обычно располагается значительное число силанольных групп, которые также энергично взаимодействуют с мономерными и полимерными ионами металлов. Тем не менее методом гель-хроматографии удастся разделить гидролизуемые полимерные соединения некоторых металлов, например рутения [12], родия(III) [13], и растворимые ферроцианиды [14—16]. Характер перемещения небольших мономерных ионов внутри сорбента, применяемого для гель-хроматографии, в значительной степени определяется ионным обменом с остаточными карбоксильными группами (благодаря которым происходит вытеснение ионов) и гидрофобной адсорбцией, особенно сильной на сефадексе LH-20, при использовании которого, кроме того, может наблюдаться эффект высаливания [17].

Гель-хроматография позволяет исследовать взаимодействия между ионами металлов и такими большими молекулами, как белки, декстраны и полифосфаты. Большинство более ранних работ, посвященных этой теме, обсуждается в красном обзоре [18]. Другая интересная область, которую можно исследовать с помощью гель-хроматографии, связана с взаимодейст-

вием между неорганическими полимерами и небольшими ионами. Так, например, сефадекс не удерживает образующийся при гидролизе полимерный ион циркония, но удерживает такие малые ионы, как хромат-ионы. Если на сефадексе G-10 разделяют смесь полимерного иона циркония и хромат-ионов, наличие медленно перемещающейся желтой зоны, а также желтая окраска элюата свидетельствуют о том, что полимер частично связывается хроматом [19].

14.9. Газовая хроматография

Опубликованная ранее литература по газовой хроматографии неорганических смесей рассмотрена в обзоре Тадмора [20], а также в монографиях Гиошона и Помье [21], Мошьера и Си-

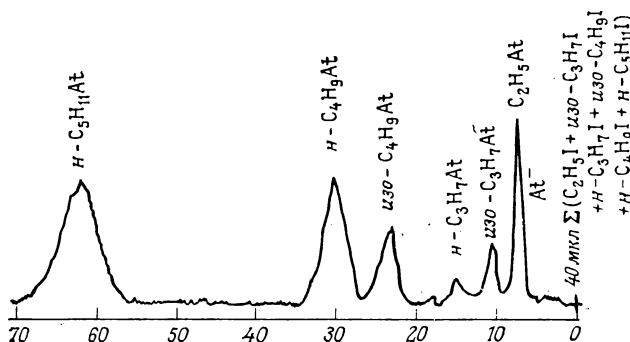


Рис. 14.23. Разделение алкиластатидов при помощи ГЖХ [29] (с разрешения автора).

Колонка: 2000×4 мм; неподвижная фаза: 10%-ный динонилфталат на хромосорбе G; газ-носитель: гелий; скорость потока: 30 мл/мин; температура, °C: 95. Алкиластатиды были получены в результате обмена иода, входящего в состав алкилиодидов, на астатин, адсорбированный на входе в колонку.

верса [22] и в обзоре Удена и Хендерсона [23]*, поэтому мы здесь укажем только некоторые основные направления исследований.

Чтобы разделить металлы методом газовой хроматографии, их сначала необходимо перевести в летучие производные с не-

* Приведем некоторые опубликованные на русском языке книги, посвященные анализу неорганических соединений.

Анвар Б. И., Другов Ю. С. Газовая хроматография неорганических веществ. — М.: Химия, 1976.

Джеферери П., Киппинг П. Анализ газов методами газовой хроматографии. — М.: Мир, 1976.

Иванова Н. Т., Фрейгулян П. А. Газохроматографический анализ нестабильных и реакционноспособных соединений. — М.: Химия, 1979.

Соколов Д. Н. Газовая хроматография летучих комплексов металлов. — М.: Наука, 1981. — Прим. ред.

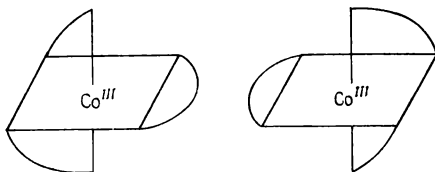
обходимыми хроматографическими характеристиками. Этим требованиям во многих случаях вполне отвечают трифторацетилацетоновые комплексы и другие подобные им производные; в литературе описано несколько удовлетворительных методов газохроматографического разделения ионов ряда металлов, например бериллия и хрома. Эти методы, по-видимому, вполне могут конкурировать с атомно-абсорбционной спектроскопией или радиоактивационным анализом [24—27].

Методами газовой хроматографии можно также разделять многие металлоорганические соединения. Например, предел обнаружения ртути в виде ее органических производных составляет $2,5 \cdot 10^{-9}\%$ [28]. С помощью газовой хроматографии можно также определять органические соединения астатина (см. рис. 14.23) [29].

Газовая хроматография дает возможность количественно определять летучие хлориды металлов (например, германия или мышьяка [30]) или исследовать их термодинамические свойства [31]. Для изучения коррозионно-активных летучих галогенпроизводных необходима специальная аппаратура.

14.10. Разделение оптических изомеров

Пары энантиомерных хелатных комплексов типа $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ или $[\text{Co}(\text{ox})_3]^{3-}$ разделяют с помощью оптически активных адсорбентов или оптически активных элюентов. Так, например, энантиомеры $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ удалось разделить на СМ-сефадексе, используя в качестве элюента D-тарtrat натрия [32]. Очевидно, что в данном случае разделение происходит благодаря образованию ионных пар между оптически активным анионом (тартратом) и двумя формами хелатных комплексов [33].



Подобные результаты были также получены с помощью электрофореза на бумаге с применением оптически активных электролитов (для катионных комплексов это обычно тарtrat или антимонитартрат, а для анионных комплексов — стрихнин, хинин и др.). Принято считать, что для разделения оптических изомеров необходима «трехточечная» адсорбция, или комплексообразование. Этими тремя точками обычно являются водородные связи и (или) ионное взаимодействие. Однако данные, полученные методом электрофореза на бумаге, свиде-

тельствуют о том, что разделение происходит даже в тех случаях, когда «трехточечное» взаимодействие невозможно или маловероятно, как, например, при разделении оптических изомеров $[\text{Fe(II)(dip)}_3]^{2+}$ в тартрате [34—36]. С помощью ионообменника (например, сильного катионообменника TSK 211) и тартрата или антимоилтартрата, применяемого в качестве элюента, были разделены нейтральные комплексы типа

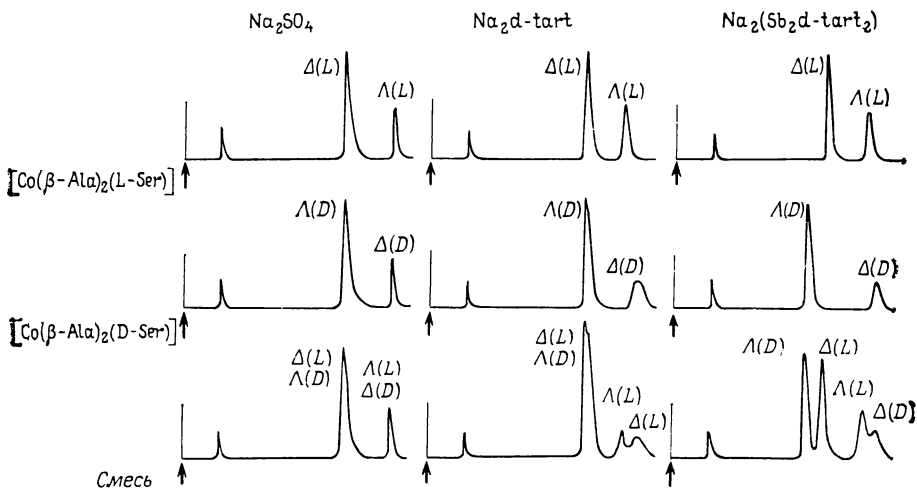


Рис. 14.24. Кривые элюирования реберных комплексов $[\text{Co(L-Ser)}_2(\beta\text{-Ala})]$ и $[\text{Co(D-Ser)}_2(\beta\text{-Ala})]$, полученные методом ионообменной хроматографии [37] (с разрешения автора).

Колонка: 250×4 мм (внутр. диам.) из нержавеющей стали; катионообменник: TSK 211 (сильнокислый); элюент: водный 0.05 М раствор H_2SO_4 , 0.1 М раствор D -тартрата натрия или 0.1 М раствор $\text{Na}_2[\text{Sb}_2(\text{D-tart})_2]$. $\Delta(\text{L})$, $\Lambda(\text{L})$, $\Delta(\text{D})$ и $\Lambda(\text{D})$ — комплексы с конфигурациями Δ или Λ , содержащие анионы L - или D -аминокислоты.

трис(аминокислота) Co(III) . Как следует из рис. 14.24, благодаря оптической активности лиганда (D - или L -серина) можно проводить разделение, применяя в качестве элюента антимоилтартрат (или тартрат), но не сульфат [37].

14.11. Разделение координационных комплексов

Многие ионы металлов, особенно Co^{3+} , Rh^{3+} , Ru^{3+} и Cr^{3+} , могут в отличие от комплексов типа FeCl_2^{2+} образовывать исключительно прочные комплексы с аммиаком, аминами, замещенными фосфинами, замещенными арсинами и стибинами. Так, например, один из простейших комплексов Co(III) , а именно $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, не разлагается при нагревании до нескольких сот градусов и при обработке его KOH . Этот комплекс образу-

ет гидроксид, который является сильным основанием, и, находясь в растворе, поглощает CO_2 из атмосферы. Такие комплексы можно выделить при помощи методов хроматографии или электрофореза в широком диапазоне pH, не опасаясь разложения. Большинство методов, применяемых для получения таких стабильных комплексов, включает, например, окисление Co(II) (воздухом или H_2O_2) в присутствии лигандов, например NH_4OH

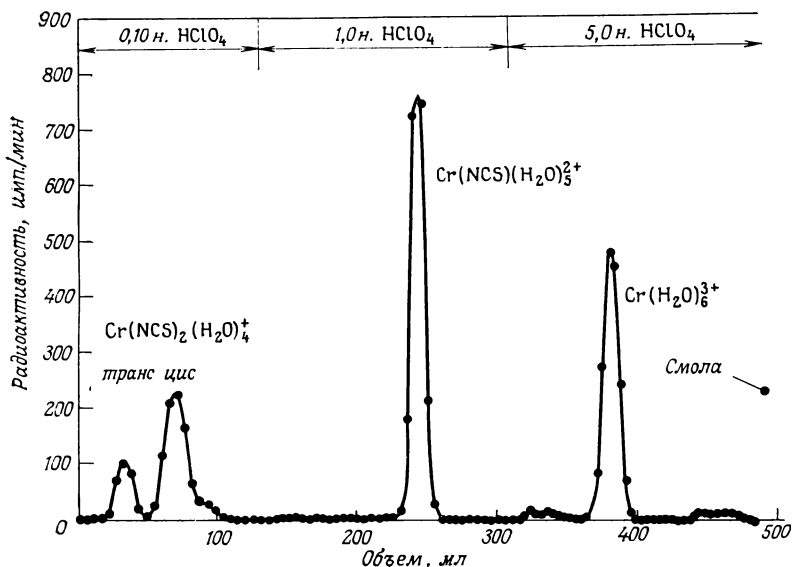


Рис. 14.25. Кривая элюирования смеси тиюцианатных комплексов хрома(III), полученная методом ионообменной хроматографии на смоле дауэкс-50 [38].

или этилендиамина. Обычно при этом образуется ряд соединений, из которых требуемое соединение выделяется кристаллизацией (в результате упаривания или добавления этанола или ацетона). Методы хроматографии позволили установить, что выделяемые при многочисленных синтезах комплексы в действительности представляют собой смесь не менее шести соединений, как, например, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_3(\text{NO}_2)_3]^0$ или $\text{Co}(\text{tn})_3\text{Cl}_3$. С помощью препаративной хроматографии впервые удалось выделить такие комплексы в чистом виде. Работы, посвященные данной области, рассматриваются в обзоре [38], и поэтому мы ограничимся лишь кратким обсуждением нескольких наиболее интересных характерных особенностей.

Бумажная хроматография до сих пор сохраняет свою популярность в качестве препаративного метода, который удобно применять в тех случаях, когда количество вещества невелико

[39, 40]. Образец исследуемого вещества в количестве до 30 мг наносят в виде линии на лист ватмана № 3 ММ и элюируют в течение 12—18 ч. Полученные в результате зоны, обычно окрашенные, можно вырезать и элюировать хроматографически. Выделенного таким образом количества индивидуальных соеди-

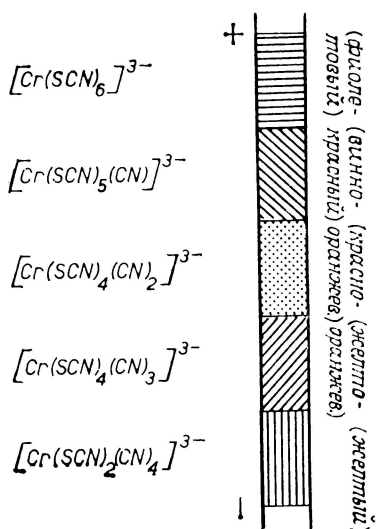


Рис. 14.26. Движущаяся граница ионифереза смеси лигандных комплексов $[Cr(SCN)_x(CN)_{6-x}]^{3-}$ (где $x=2 \dots 6$) [43] (с разрешения автора).

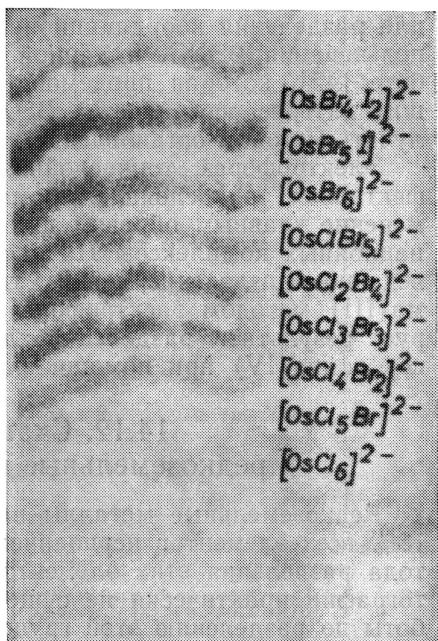


Рис. 14.27. Бумажный электрофорез хлоробромо- и бромодиокомплексов осмия(IV) [3] (с разрешения автора).

нений обычно бывает достаточно для дальнейших анализов и спектроскопических исследований.

Ионообменная колоночная хроматография применяется практически во всех работах по синтезу — обычно с целью очистки или отделения нескольких комплексов от реакционной смеси. Этим методом можно получать от 10 до 100 мг вещества. Типичный пример такого разделения показан на рис. 14.25.

Разделение координационных комплексов Йенсен и сотр. [41] рекомендуют проводить на оксиде алюминия главным образом потому, что на белом оксиде алюминия легко различить

окрашенные комплексы, слабо заметные на коричневой ионообменной смоле. Если при разделении на оксиде алюминия элюентом служит вода, оксид функционирует в основном как ионообменник (поверхностные алюминатные группы); при этом возможно также образование комплексов, имеющих внешнюю координационную сферу.

ВЭЖХ пока еще не нашла достаточно широкого применения для разделения координационных комплексов. Перспективы использования ВЭЖХ в данной области рассматриваются в работе [42], которая продемонстрировала одну из представляющих интерес особенностей ВЭЖХ: спектры элюата можно получать методом остановленной струи.

Электрофорез, тонкослойная хроматография и высокоэффективная тонкослойная хроматография нашли широкое применение главным образом при исследованиях реакций координационных комплексов. На рис. 14.26 показано прекрасно проведенное разделение серии тиоцианат-цианокомплексов хрома(III) методом электрофореза [43], а рис. 14.27 демонстрирует результаты разделения хлоробромо- и бромодиодоккомплексов осмия(IV) при помощи электрофореза на бумаге [3].

14.12. Скандий, иттрий, редкоземельные металлы и актиний

Редкоземельные металлы вместе с Sc, Y и Ac составляют 18% всех элементов периодической таблицы. Эффективного метода разделения этих элементов вплоть до разработки хроматографии практически не существовало. Первые успешные работы по разделению этой группы металлов были проведены во время второй мировой войны [44, 45], и эти работы являются одними из лучших примеров того, как можно, используя подходящий комплексообразующий агент, разделить эти металлы на ионообменнике. В дальнейшем были разработаны многочисленные методики колоночной хроматографии, включая ВЭЖХ [46, 47], тонкослойной хроматографии (рис. 14.28) [48, 49], электрофореза на бумаге (рис. 14.29) [50] и изотахофореза (рис. 14.30) [51].

Хроматография оказалась лучшим препаративным способом выделения редкоземельных элементов в граммовых количествах, и в ряде лабораторий была разработана методика крупномасштабного препаративного разделения этих элементов (в качестве типичного примера см. рис. 14.31), в основу которой положены работы группы Спиддинга [52—54], продемонстрировавшей, что наиболее эффективным препаративным методом разделения является метод вытеснения. Роль комплексообразующих агентов выполняют чаще всего органические со-

единения, в первую очередь лимонная кислота, затем α -оксимасляная кислота, а также молочная и этилендиаминтетрауксусная кислоты, которые обеспечивают лучшее разделение (благодаря большому различию констант устойчивости комплексов). Для разделения более легких редкоземельных элементов можно также применять азотную кислоту [55].

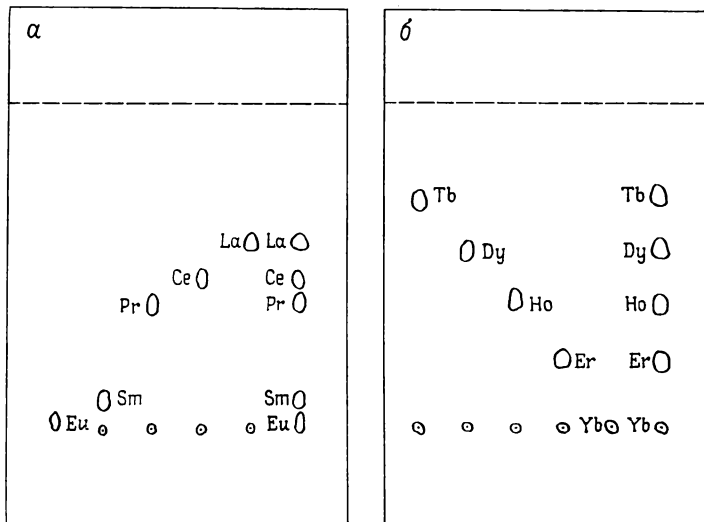


Рис. 14.28. Разделение при помощи метода ТСХ редкоземельных элементов группы церия (а) и иттербия (б) [48] (с разрешения автора).

Слой: смесь 30 г силикагеля, 12 мл ди-(2-этилгексил)фосфорной кислоты и 34 мл бутанола-1, толщина 500 мкм; элюенты: 0,5 н. HCl (а) и 4 н. HNO₃ (б).

14.13. Конденсированные фосфаты

Развитие методов хроматографии в значительной мере способствовало развитию химии конденсированных фосфатов. Этой области химии посвящено несколько хороших обзоров и отдельная монография [56—58]. В настоящее время хроматография является классическим (если не единственным) методом идентификации новых фосфатов или смешанных арсенато-фосфатов.

После того как было выяснено, что содержащиеся в бумаге типа ватман (вследствие применения при ее изготовлении жесткой воды) ионы Ca²⁺ и Mg²⁺ можно удалить промывкой подходящей кислотой, бумажную хроматографию начали применять во всех новых исследованиях. Впоследствии были разработаны прекрасные методики тонкослойной и ионообменной хроматографии, гель-хроматографии и ВЭЖХ. Оглядываясь на-

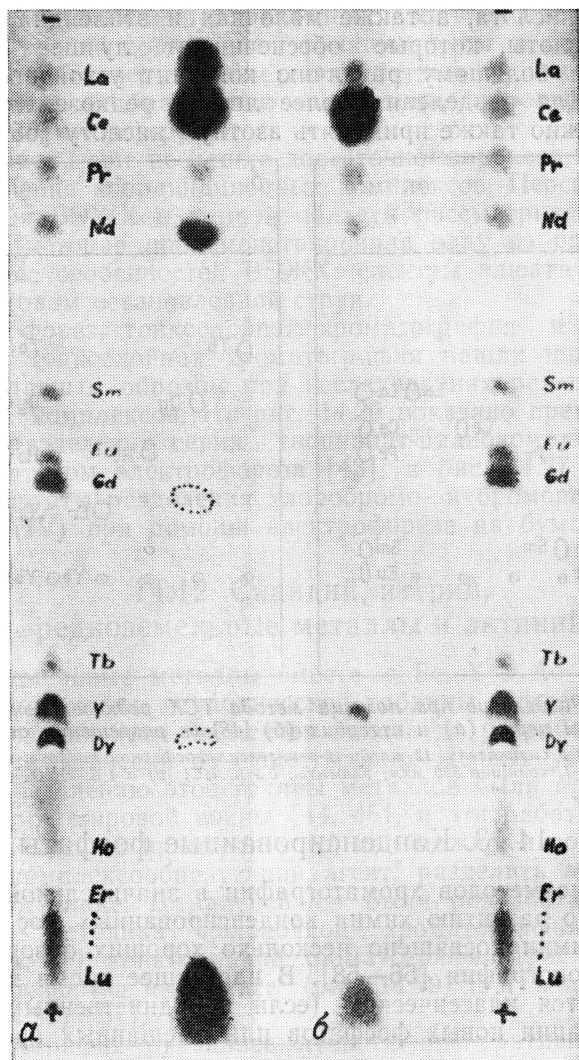


Рис. 14.29. Количественный анализ смеси ионов редкоземельных металлов при помощи бумажного электрофореза в лигандной буферной системе $Zn^{2+}-ZnL^{2-}$ (рН 2) [50] (с разрешения автора).

Анализируемые образцы: кремний (а), сплав редкоземельных металлов (б); бумага: ватман № 2; падение потенциала: 28–30 В/см; концентрация свободных лигандов: $10^{-17,5}$ М.

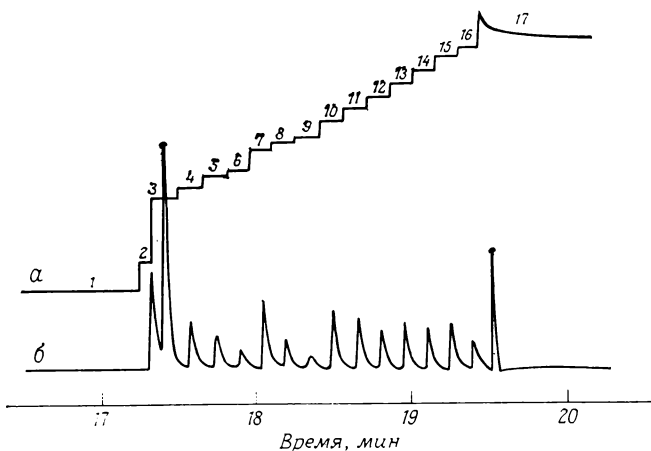


Рис. 14.30. Изотахорограмма одновременного разделения смеси лантаноидов [51] (с разрешения автора).

α — градиент потенциала, δ — дифференциальный градиент. Ведущий электролит: 0,027 М КОН, 0,015М 2-оксиэтомасляная кислота, уксусная кислота и 0,00250%-ный поливиниловый спирт, рН 4,92; ток миграции: 225 мкА; скорость перемещения диаграммы: 40 мм/мин; образец: 5,0 мкл 10^{-3} М раствора смеси лантаноидов, 1 — K^+ , 2 — Na^+ , 3 — La^{3+} , 4 — Ce^{3+} , 5 — Pr^{3+} , 6 — Nd^{3+} , 7 — Sm^{3+} , 8 — Eu^{3+} , 9 — Gd^{3+} , 10 — Tb^{3+} , 11 — Dy^{3+} , 12 — Ho^{3+} , 13 — Er^{3+} , 14 — Tm^{3+} , 15 — Yb^{3+} , 16 — Lu^{3+} , 17 — $\beta-Ala$.

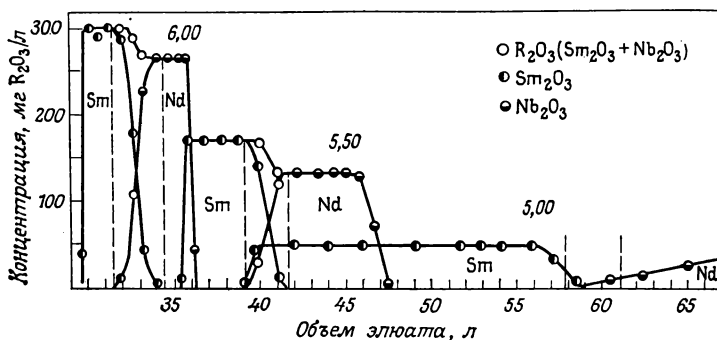


Рис. 14.31. Препаративная ионообменная хроматография редкоземельных элементов (из работы [73]).

Колонка: 120×2.2 см; катионообменник: амберлит IR-100 (30—40 меш); элюент: 0,1%-ный раствор цитрата, рН 5,0, 5,5 и 6,0; скорость потока: 0,5 см/мин; образец: 1,713 г эквимолярной смеси Sm_2O_3 и Nd_2O_3 .

Штриховые вертикальные линии показывают области перекрытия зон Sm и Nd.

зад, можно сказать, что эти методики позволили повысить точность количественного анализа и ускорить разделение, но сколько-нибудь существенного влияния на аналогичные характеристики бумажной хроматографии они не оказали. Некоторые типичные примеры разделения показаны на рис. 14.32—14.34.

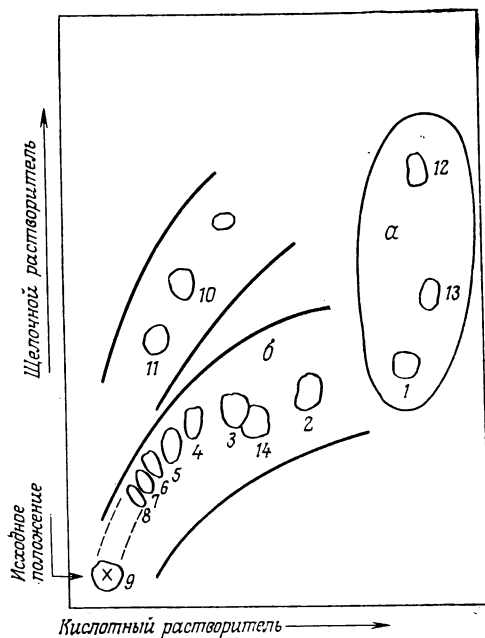


Рис. 14.32. Разделение смеси фосфорных оксикислот при помощи двумерной бумажной хроматографии [58] (с разрешения автора).

Щелочной растворитель: пропанол-2 — бутанол-2 — вода — 20%-ный аммиак (40:20:39); кислотный растворитель: пропанол-2 — вода — 20%-ная трихлоруксусная кислота — 25%-ный аммиак (700 : 100 : 200 : 3); соединения: 1 — ортофосфат, 2 — пирофосфат, 3 — трифосфат, 4 — тетрафосфат, 5 — пентафосфат, 6 — гексафосфат, 7 — гептафосфат, 8 — октафосфат, 9 — соль Грэма, 10 — триметафосфат, 11 — тетраметафосфат, 12 — гипофосфит, 13 — фосфит, 14 — гипофосфит.

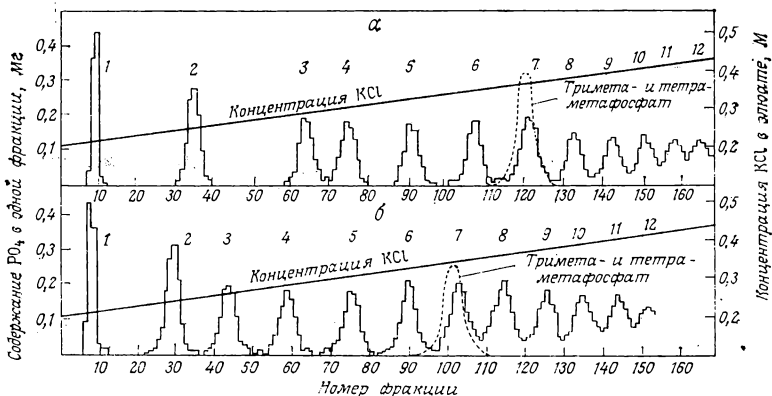


Рис. 14.33. Ионообменная хроматография смеси полифосфатов [58].
Ионообменник: дауэкс 1-Х4; элюирование: градиентное боратым буферным раствором, pH 8,0 (α) и аммиачным буферным раствором, pH 9,3 (β).

14.14. Силикаты

В ряде работ сообщается о разделении при помощи метода бумажной хроматографии полисиликатов, однако проверить эти данные не представляется возможным. В работе [59] сообщается об отделении монокремниевой кислоты от поликремние-

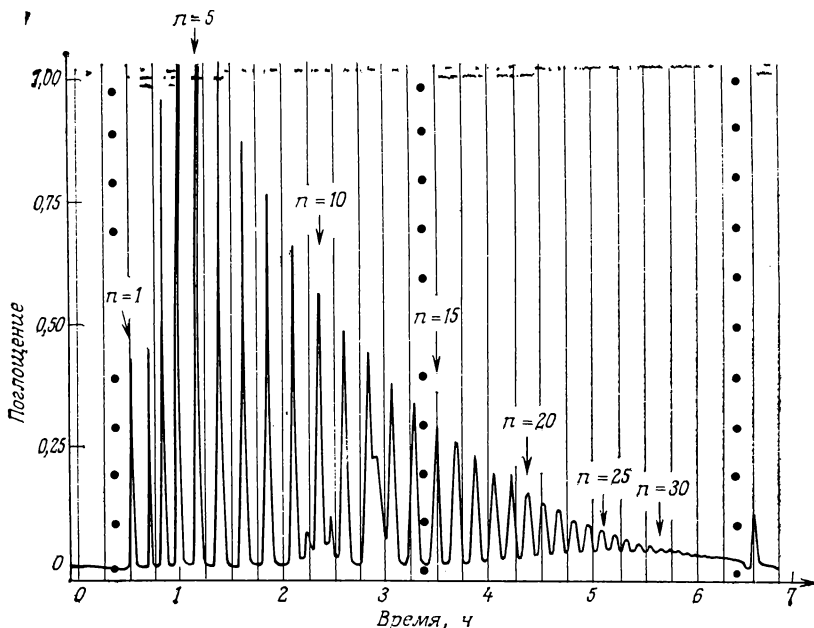


Рис. 14.34. Разделение смеси Na_3PO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ и $\text{Na}_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$ (для $\bar{n}=5$ и $\bar{n}=10$) [74] (с разрешения автора).

Колонка: 100×9 мм; неподвижная фаза: анионообменная смола хитачи 2630 (4% поперечных связей); элюент: NaCl — 5 мМ Na_4EDTA , pH 10,0, градиент NaCl от 0,22 до 0,53 М за 6 с.

вой методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25. Однако образующиеся при этом промежуточные соединения, как нам представляется, слишком нестабильны, чтобы их можно было выделить указанным методом. Как следует из данных работ [60, 61], при помощи ГХ были разделены ТМС-производные конденсированных силикатов [60, 61], однако в процессе получения производных анализируемые образцы претерпевают значительные изменения. В более поздней работе [62] сообщается о разделениях ТМС-производных полисиликатов с использованием как ГХ, так и гель-хроматографии. Типичные результаты разделения показаны на рис. 14.35 и 14.36. Методом гель-хроматографии можно исследовать даже коллоидный диоксид кремния [63].

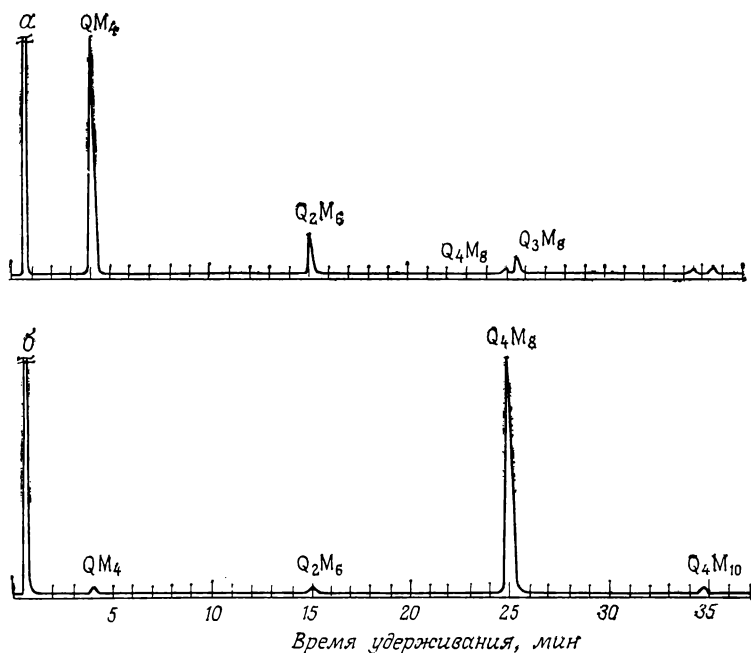


Рис. 14.35. Хроматограммы, полученные при исследовании при помощи ГХ **триметилсилилированных образцов оливина (а) и ломонтита (б)** [62] (с разрешения автора).

Колонка: 3,0 м×3,0 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза: 2% OV-1 на хромосорбе WAW DMCS (60–80 меш); газ-носитель: гелий; температура: программированный подъем температуры от 100 до 300 °C со скоростью 5 °C/мин; детектор: пламенно-ионизационный. Q — один тетраэдр, соответствующий одной группе SiO₂ в системе конденсированного силиката; M — группа (CH₃)₃SiO_{1/2}, образующаяся в результате реакции триметилсилилирования.

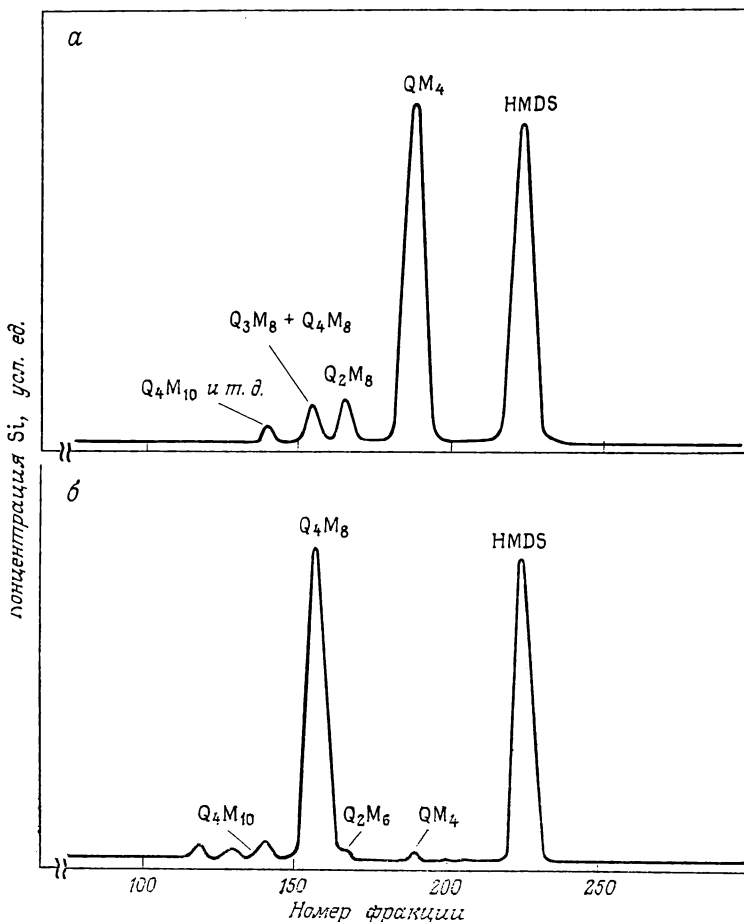


Рис. 14.36. Хроматограммы, полученные при исследовании при помощи гель-хроматографии триметилсилилированных образцов оливина (а) и ломонтита (б) [62] (с разрешения автора).

Две колонки: $90 \times 1,5$ см (внутр. диам.) общим объемом приблизительно 318 мл; гель: био-бедс S-X1; элюент: пропанол-2 — хлороформ (2:3). Q — один тетраэдр, соответствующий одной группе SiO_2 в системе конденсированного силиката; M — группа $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}_{1/2}$, образующаяся при триметилсилилировании.

Литература

1. Lederer M., Majani C. Chromatogr. Rev., 12, 239 (1970).
2. Brinkman U. A. Th., de Vries G., Kuroda R. J. Chromatogr., 85, 187 (1973).
3. Blasius E., Preetz W. Chromatogr. Rev., 6, 191 (1964).
4. Small H., Stevens T. S., Bauman W. C. Anal. Chem., 47, 1801 (1975).
5. Gjerde D. T., Schmuckler G., Fritz J. S. J. Chromatogr., 187, 35 (1980).
6. Gjerde D. T., Fritz J. S. J. Chromatogr., 188, 391 (1980).

7. Schwedt G. *Chromatographia*, **12**, 613 (1979).
8. Thompson S. G., Harvey B. G., Choppin G. R., Seaborg G. T. *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 6229 (1954).
9. Horwitz E. P., Delphin W. H., Bloomquist C. A. A., Vandegrift G. F. *J. Chromatogr.*, **125**, 203 (1976).
10. Reeve R. N. *J. Chromatogr.*, **177**, 393 (1979).
11. Agres J. A. *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2879 (1947).
12. Kitayevitch I., Rona M., Schmuckler G. *Anal. Chim. Acta*, **61**, 277 (1972).
13. Sinibaldi M., Braconi A. *J. Chromatogr.*, **94**, 338 (1974).
14. Saito H., Matsumoto Y. *J. Chromatogr.*, **168**, 227 (1979).
15. Matsumoto Y., Shirai M., Saito H. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **41**, 210 (1975).
16. Corradini D., Sinibaldi M. *J. Chromatogr.*, **187**, 458 (1980).
17. Di Gregorio V., Sinibaldi M. *J. Chromatogr.*, **129**, 407 (1976).
18. Yoza N. *J. Chromatogr.*, **86**, 325 (1973).
19. Sinibaldi M., Matricini G., Lederer M. *J. Chromatogr.*, **129**, 412 (1976).
20. Tadmor J. *Chromatogr. Rev.*, **5**, 223 (1963).
21. Guiochon G., Pommier C. *Gas Chromatography in Inorganics and Organometallics*, MI, Ann Arbor: Ann Arbor Sci. Publ., 1973.
22. Мюшпер П., Сварс П., Газовая хроматография хелатов металлов: Пер. с англ. — М.: Мир, 1967.
23. Uden P. C., Henderson D. E. *Analyst (London)*, **102**, 889 (1977).
24. Hansen L. C., Scribner W. G. *Anal. Chem.*, **43**, 349 (1971).
25. Wolf W. R., Taylor M. L., Hughes B. M., Tiernan T. O., Sievers R. E. *Anal. Chem.*, **44**, 616 (1972).
26. Black M. S., Sievers R. E. *Anal. Chem.*, **48**, 1872 (1976).
27. Lo J. G., Yeh S. J. *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 359 (1980).
28. Jones P., Nickless G. *J. Chromatogr.*, **89**, 201 (1974).
29. Gesheva M., Kolachkovsky A., Norseyev Yu. *J. Chromatogr.*, **60**, 414 (1971).
30. Iatridis B., Parissakis G. *J. Chromatogr.*, **122**, 505 (1976).
31. Rudolph J., Bächmann K. *J. Chromatogr.*, **187**, 319 (1980).
32. Yoshikawa Y., Yamasaki K. *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, **6**, 523 (1976).
33. Nakazawa H., Yoneda H. *J. Chromatogr.*, **160**, 89 (1979).
34. Ossicini L., Celli C. *J. Chromatogr.*, **115**, 655 (1975).
35. Cardaci V., Ossicini L., Prosperi T. *Ann. Chem. (Rome)*, **68**, 713 (1978).
36. Cardaci V., Ossicini L. *J. Chromatogr.*, **198**, 76 (1980).
37. Yamazaki S., Yukimoto T., Yoneda H. *J. Chromatogr.*, **175**, 317 (1979).
38. Carunchio V., Grassini Strazza G. *Chromatogr. Rev.*, **8**, 260 (1966).
39. Bang O., Engberg A., Rasmussen K., Woldbye F. *Acta Chem. Scand.*, **29**, 749 (1975).
40. Dwyer F. P., MacDermott T. E., Sargeson A. M. *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2913 (1963).
41. Jensen A., Bjerrum J., Woldbye F. *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1202 (1958).
42. Grassini Strazza G., Polcaro C. M. *J. Chromatogr.*, **147**, 516 (1978).
43. Blasius E., Augustin H., Wenzel U. *J. Chromatogr.*, **50**, 319 (1970).
44. Ketelle B. H., Boyd G. E. *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2800 (1947).
45. Tompkins E. R., Khym J. X., Cohn W. E. *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2769 (1947), and the other papers in this issue.
46. Schoebrechts F., Merciny E., Duyckaerts G. *J. Chromatogr.*, **174**, 351 (1979).
47. Schoebrechts F., Merciny E., Duyckaerts G. *J. Chromatogr.*, **179**, 63 (1979).
48. Holzapfel H., Le Viet Lan, Werner G. *J. Chromatogr.*, **24**, 153 (1966).
49. Holzapfel H., Le Viet Lan, Werner G. *J. Chromatogr.*, **20**, 580 (1965).
50. Jokl V., Pikulíková Z. *J. Chromatogr.*, **74**, 325 (1972).
51. Nukatsuka I., Taga M., Yoshida H. *J. Chromatogr.*, **205**, 95 (1981).
52. Powell J. E., Spedding F. H. *Chem. Eng. Progr., Symp. Ser.*, **55**, 101 (1959).

53. James D. B., Powell J. E., Burkholder H. R. *J. Chromatogr.*, **35**, 423 (1968).
54. Spedding F. H. *Discuss. Faraday Soc.*, **7**, 214 (1949).
55. Ishida K. *Bunseki Kagaku (Jap. Anal.)*, **19**, 1250 (1970).
56. Hettler H. *Chromatogr. Rev.*, **1**, 225 (1959).
57. Grunze H., Thilo E. *Die Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*. Berlin: Akademie Verlag, 1954/1955.
58. Ebel J. P. In: *Metodi di Separazione nella Chimica Inorganica*, Vol. 1, Rome: CNR, 1963, p. 199.
59. Tarutani T. *J. Chromatogr.*, **50**, 523 (1970).
60. Garzó G., Hoebbel D., Écsery Z. J., Ujszaszi K. *J. Chromatogr.*, **167**, 321 (1978).
61. Garzó G., Hoebbel D. *J. Chromatogr.*, **119**, 173 (1976).
62. Shimono T., Takagi H., Isobe T., Tarutani T. *J. Chromatogr.*, **197**, 59 (1980).
63. Kirkland J. J. *J. Chromatogr.*, **185**, 273 (1979).
64. Blasius E. — In: *Metodi di Separazione nella Chimica Inorganica*, Vol. 1, Rome: CNR, 1963, p. 141.
65. Kraus K. A., Nelson F. J. *J. Chromatogr.*, **1**, X (1958).
66. Guedes de Carvalho R. A. *J. Chromatogr.*, **1**, XII (1958).
67. Cerrai E., Ghersini G. *J. Chromatogr.*, **24**, 383 (1966).
68. Przeslakowski S. *Chromatogr. Rev.*, **12**, 383 (1970).
69. Lederer E., Lederer M. *Chromatography — A Review of Principles and Applications*. 2nd Edn. Amsterdam: Elsevier, 1957, p. 468.
70. Kawazu K. *J. Chromatogr.*, **137**, 381 (1977).
71. Lederer M. — In: *Metodi di Separazione nella Chimica Inorganica*, Vol. 1, Rome: CNR, 1963, p. 109.
72. Lederer M., Mazzei M. *J. Chromatogr.*, **35**, 201 (1968).
73. Lederer E., Lederer M. *Chromatography — A Review and Applications*. 2nd Edn. Amsterdam: Elsevier, 1957, p. 448.
74. Yamaguchi H., Nakamura T., Hirai Y., Ohashi S. *J. Chromatogr.*, **172**, 131 (1979).

Глава 15

Неуглеводородные газы

Ярослав Янак

15.1. Введение

Для развития современного газового анализа характерен переход от классических методов к методам, основанным на измерении физических величин, и по мере совершенствования измерительной аппаратуры от макро- к микротехнике. Хотя это направление развития прослеживается уже с начала нашего века, значительное ускорение его темпов наметилось в 50-х годах, когда в основу газового анализа были положены хроматографические методы, в результате чего стали возможны анализ сложных смесей и определение микрокомпонентов. Разумеется, интерес к анализу постоянных и углеводородных газов был связан с необходимостью решения важных практических задач. Наиболее подходящим методом в данном случае является про-явительная газoadсорбционная хроматография. Однако при решении некоторых задач (например, при обогащении или определении состава газов, содержащих пары высококипящих или, наоборот, низкокипящих веществ) применяются фронтальная и вытеснительная хроматография, а также ГЖХ.

Последние десять лет не только ознаменовались изменениями в методиках анализа и аппаратурном оснащении промышленных лабораторий, но и появлением новых направлений, как теоретических, так и практических (в частности, начали разрабатываться методы контроля за окружающей средой и степенью ее загрязненности, а также диагностические методы в медицине). Задачами современной газовой хроматографии уже не являются только разделение и анализ самих газов; установлено, что методами ГХ можно определять содержащиеся в газах или транспортируемые ими побочные продукты. Температуры кипения наиболее важных газов указаны на рис. 15.1. В настоящее время основное внимание уделяется главным образом определению микрокомпонентов в газах, загрязняющих окружающую среду. Эта тенденция нашла отражение в литературе: в настоящее время уже опубликованы тысячи хроматографических методик анализа газов. Помочь обоснованному выбору конкретной методики могут монографии [1—9] и обзор-

ры [10, 11]*, а особые случаи применения ГХ можно найти в оригинальной литературе (см. библиографический раздел «Journal of Chromatography»). Цель настоящей главы — обобщить недавно опубликованные материалы по современным на-

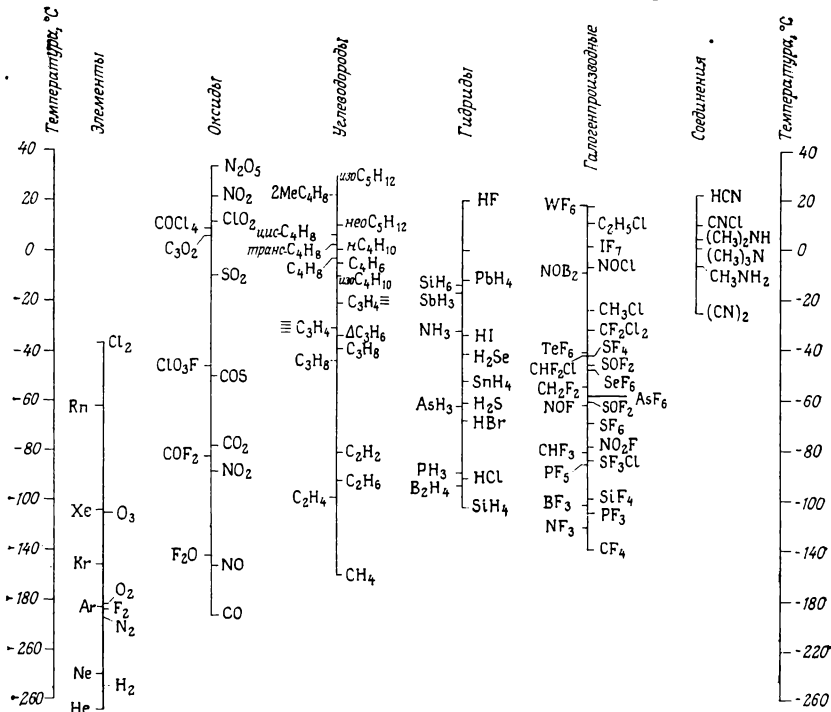


Рис. 15.1. Температуры кипения основных представителей различных классов газов.

учным исследованиям и прикладным работам в данной области. Отметим, что ссылки на литературу, опубликованные в предыдущем издании данной монографии [5], в основном сохранили свое значение и все еще могут служить источником допол-

* В дополнение к литературе этой главы укажем следующие обзорные статьи и монографии, в которых обсуждаются вопросы хроматографического анализа газов:

1. Янак Я. Успехи хроматографии. — М.: Наука, 1972, с. 168.
2. Киселев А. В., Яшин Я. И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. — М.: Химия, 1979.
3. Другов Ю. С., Березкин В. Г. Газохроматографический анализ загрязненного воздуха. — М.: Химия, 1981.
4. Витенберг А. Г., Иоффе Б. В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. — Л.: Химия, 1982. — Прим. ред.

нительной информации, поскольку прежние ссылки на оригинальные статьи повторяются в настоящей главе только в исключительных случаях. При любом удовлетворительном газохроматографическом разделении необходимо, чтобы разность давлений паров и коэффициентов разделения при приемлемом значении коэффициента емкости колонки (абсолютный объем удерживания должен быть равен примерно 10—100 мл/г при соответствующей температуре) была достаточно велика. Меняя эти параметры, можно изменять коэффициент емкости для любого газа или пара в ту или другую сторону с тем, чтобы диапазон объемов удерживания соответствовал необходимым значениям. Следует, однако, учитывать некоторые характерные особенности, свойственные хроматографическому газовому анализу. Ввиду зависимости объема и давления газов от температуры для работы с ними требуется применять специальные методы. Из-за сравнительно малой разности молекулярных масс анализируемого газа и газа-носителя детекторы необходимо калибровать для каждого компонента. Твердые сорбенты редко обладают гомогенной структурой с одинаковыми порами (к числу немногих исключений относятся молекулярные сита), что является причиной значительной нелинейности изотерм сорбции при концентрациях, характерных для процесса разделения методом газовой хроматографии. Природа газа-носителя влияет на удерживание и форму пиков разделяемых соединений, так как адсорбция газа-носителя значительно изменяет физические и химические свойства поверхности твердого адсорбента.

15.2. Разделение газов и его применение

15.2.1. Общие соображения

Разделение постоянных газов можно проводить на любом материале, имеющем приемлемую сорбционную емкость. Эта емкость определяется достаточно большой удельной поверхностью твердого тела (характеризуется площадью поверхности) или растворяющей способностью жидкости (характеризуется площадью поверхности и объемом жидкой фазы). Данному условию вполне удовлетворяют твердые тела с микропористой структурой, которые используются в качестве сорбентов или твердых носителей жидкой фазы, распределенной по поверхности в виде тонкой пленки. Очевидно, что молекулы газа-носителя в определенной степени проникают в поры поверхности твердого тела, а также насыщают жидкую фазу. В результате этого

а) физическая природа адсорбента меняется, реальная (действующая) площадь поверхности уменьшается, а средний диа-

метр пор, участвующих в разделении, увеличивается из-за блокировки более узких пор, что может привести к уменьшению времени удерживания и улучшению линейности изотерм сорбции, но одновременно с этим конкуренция газов за центры адсорбции вызывает определенные явления вытеснения;

б) химическая природа поверхности адсорбента также меняется, и это может вызвать значительные изменения в ее полярности и повлиять на последовательность элюирования некоторых газов. Насыщение жидкости газом-носителем иногда приводит к значительному изменению химического потенциала, что оказывает определенное влияние на адсорбцию на поверхности, на процесс массопереноса на границе между газовой и жидкой фазами и на растворимость анализируемого газа в жидкой фазе.

Эти явления можно проиллюстрировать практическими примерами. Если газом-носителем служит диоксид углерода (аммиак, вода, пар и др.), а адсорбентом — активный древесный уголь, хуже сорбируемые газы дают симметричные пики (например, аргон) или пики с острым фронтом (например, водород), в то же время те газы, которые сорбируются сильнее, чем диоксид углерода (например, пропан), дают несимметричные пики со значительным «хвостом». Такая же картина наблюдается в том случае, если адсорбентом служит тот же активный уголь, а газом-носителем — водород при пониженной температуре (-196°C). В этих условиях неон, который сорбируется слабее, образует пик с отвесным фронтом, а аргон, который сорбируется сильнее, дает «хвост». Если в качестве адсорбентов используются силикагель, оксид алюминия, алюмосиликаты и т. д., диоксид углерода сорбируется сильнее, чем пропан, и только более тяжелые, чем бутан, углеводороды дают «хвосты»; время удерживания всех газов при этом, как правило, уменьшается. Однако наиболее узкие поры активного древесного угля, имеющего большую удельную поверхность, блокируются диоксидом углерода, что препятствует разделению смеси газов $\text{Ar}-\text{O}_2-\text{N}_2$, но, заменив диоксид углерода на водород, можно отделить $\text{Ar}-\text{O}_2$ от N_2 особенно при пониженной температуре. На молекулярных ситах, кристаллическая решетка которых пронизана геометрически однородными порами молекулярных размеров, разделение пар O_2+N_2 происходит очень легко, если газом-носителем служит H_2 , He или Ne ; в этих условиях можно разделить целый ряд газов. Если газом-носителем служит CO_2 или N_2O , молекулы этих газов заполняют внутренние поры, и в результате полностью отделить один постоянный газ от другого невозможно.

Химическая природа сорбентов влияет на селективность разделения. Углеродистые сорбенты (активный древесный уголь,

Таблица 15.1. Влияние полярности сорбента и температуры на коэффициенты удерживания некоторых постоянных газов^а

Анализируемый газ	Молекулярные сита 5А, увлажненные водой (18 °С), %			Температура, °С (содержание воды 3,5%)			
	2,07	4,18	9,43	20	50	100	135
Кислород	0,19	0,18	0,15	0,20	0,24	0,30	0,33
Азот	0,45	0,36	0,28	0,45	0,45	0,47	0,45
Метан	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Оксид углерода	2,32	1,18	0,68	2,16	1,40	1,00	0,75

^а Рассчитаны по данным работы [12].

порошок угля на твердом носителе) обнаруживают слабую селективность по отношению к газам, содержащим углерод, таким, как CO , CH_4 , CO_2 , COS и CS_2 . Твердые вещества, в молекулах которых имеются оксигруппы и (или) кислородные мостики (связи), например силикагель, оксид алюминия и молекулярные сита, проявляют отчетливо выраженную селективность по отношению к таким соединениям, которые могут участвовать в донорно-акцепторных взаимодействиях (например, ненасыщенные углеводороды, полярные или поляризуемые молекулы). Влияние полярности поверхности на последовательность элюирования некоторых газов показывают данные, приведенные в табл. 15.1 [12]. При увлажнении молекулярных сит 5А парами воды их удельная площадь поверхности уменьшается (и соответственно уменьшается время удерживания всех газов), и, кроме того, в результате изменения их полярности меняется последовательность элюирования соединений в смеси $\text{CH}_4 + \text{CO}$. Такой же эффект наблюдается при повышении температуры. Введение в молекулярные сита алюмосиликатного типа ионов таких металлов, как Ag, Zn, Cd, Cu и Ni, может привести к увеличению селективности адсорбции и иногда к сильной хемосорбции анализируемых соединений. Разделение газов можно проводить на пористых твердых неорганических сорбентах, на поверхности которых имеются химически связанные органические функциональные группы. В настоящее время для разделения газов с большим успехом используются синтетические органические высокопористые полимеры; они сочетают лучшие свойства твердых тел (регулярную пористость) с лучшими свойствами жидкости (линейное распределение). Разделение специфических газовых смесей можно также успешно осуществлять на твердых носителях с нанесенными жидкими фазами, т. е. при помощи метода ГЖХ.

15.2.2. Постоянные газы

Наиболее успешные разделения H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 и CO при комнатной температуре были проведены на молекулярных ситах 5A или 13X [14]. Однако на практике очень часто смеси этих газов содержат ряд примесей, таких, как CO_2 и пары воды, газообразные углеводороды и иногда газообразные азот- или серосодержащие соединения. В такой ситуации весьма перспективным представляется разделение на синтетических органических твердых сорбентах, например сополимерах стирола — этилвинилбензола — дивинилбензола с определенной пористой структурой [15]. Например, постоянные газы легко разделяются при $-70^\circ C$ и не разделяются при комнатной температуре. Насколько велики возможности разделения на пористых органических полимерах, показывают коэффициенты удерживания, приведенные в табл. 15.2 [16].

Применяемые системы обнаружения должны учитывать природу газов, с которыми приходится иметь дело, обладать опре-

Таблица 15.2. Данные по удерживанию некоторых газов на синтетических полимерах типа порapak^a

Газ	Порапак Q ^б			Порапак R ^б			Порапак T ^б		
	Температура, °C								
	—78	+26	+65	—78	+26	+65	—78	+26	+65
H ₂	—	0,16	0,32	0,29	0,19	0,34	0,31	0,07	0,25
N ₂	0,72	0,23	0,42	0,78	0,23	0,40	0,81	0,10	0,29
O ₂	0,90	0,23	0,42	0,91	0,23	0,40	0,94	0,10	0,29
Ar	1,00	0,23	0,42	1,00	0,23	0,40	1,00	0,10	0,29
CO	1,23	0,26	—	1,19	0,25	—	1,30	0,11	—
NO	1,65	0,26	0,48	1,40	0,26	0,43	1,86	0,12	0,39
CO ₂	—	1,00	1,00	—	1,00	1,00	—	1,00	1,00
N ₂ O	—	1,42	1,24	—	1,24	1,18	—	—	—
H ₂ O	—	5,46	3,25	—	30,9	13,6	—	30,9	22,6
H ₂ S	—	5,26	3,15	—	6,1	3,47	—	5,06	3,40
COS	—	11,1	5,21	—	9,2	4,94	—	6,52	4,00
SO ₂	—	22,6	6,85	—	—	19,6	—	—	22,4
CS ₂	—	—	72,2	—	—	—	—	—	48,0
HCN	—	17,8	5,17	—	—	31,3	—	—	34,0
CH ₄	—	0,42	0,57	5,92	0,39	0,56	6,57	0,18	0,41
CH ₃ CH ₃	—	3,27	2,24	—	2,66	2,01	—	1,40	1,18
CH ₂ =CH ₂	—	—	1,66	—	1,84	1,57	—	1,18	1,07
CH=CH	—	—	1,66	—	3,03	2,01	—	3,19	2,49
CH ₃ CH ₂ CH ₃	—	20,0	8,22	—	14,0	7,77	—	6,75	5,47
CH ₂ =CHCH ₃	—	15,3	7,18	—	11,6	6,93	—	7,85	5,85

^a Рассчитаны по данным работы [16], полученным с применением в качестве газаносителя гелия (без поправки на мертвый объем).

^b Производится Waters Assoc., Framingham, MA, USA.

деленной селективностью, чувствительностью и иметь определенный диапазон линейности сигнала. При проведении рутинных анализов газов с гелием или водородом в качестве газаносителя чаще всего применяется детектор по теплопроводности [17]. К сожалению, его необходимо калибровать отдельно для каждого газа. Чтобы при помощи этого детектора можно было определять микроколичества газов, его чувствительность была повышена [18]. При помощи пламенно-ионизационного детектора можно с успехом обнаруживать газообразные углеводороды. Однако этот детектор пригоден также для обнаружения оксида и диоксида углерода в виде метана; непосредственно перед введением в ПИД газы восстанавливают. Принято считать, что обычный ПИД не реагирует на постоянные и родственные им газы [20], но относительно недавно был разработан «обогащенный водородом» пламенно-ионизационный детектор с необходимой для анализа постоянных и других неорганических газов чувствительностью [21]. Для специального газового анализа очень часто применяются ионизационные детекторы (в частности, аргоновые и гелиевые) [22—24], детекторы с захватом электронов и масс-спектрометры [25—27]. Существуют и другие, реже применяемые, но, вероятно, тоже полезные системы обнаружения, предусматривающие, например, измерение модуляции ультразвука [28] или электрохимической активности некоторых газов (оксида углерода, азота и оксидов серы) [29, 30]. Дополнительная информация по этому вопросу содержится в статье [31].

Прибор, предназначенный для анализа газов, должен быть сконструирован с учетом того, что входящие в состав исследуемой смеси газы могут значительно различаться по своей химической природе или давлению, как, например, водород, диоксид углерода и пары воды. Для разделения многокомпонентных смесей разработаны системы с двумя и большим числом колонок [32, 33], в которых можно провести деление потока, «вырезание компонентов» и обратную продувку, и созданы специальные сорбенты, улучшающие характеристики колонок [34]. Как правило, через первую колонку (обычно ГЖ) постоянные газы проходят без разделения, в то время как более сильно удерживаемые компоненты хорошо разделяются. Далее фракция постоянного газа дается на вторую колонку (обычно ГА), где она разделяется при пропускании потока второго газа-носителя или удерживается здесь некоторое время (метод «вырезания» и фракционирования компонентов). В работе [35] описана двухфазная колонка: внутри одной колонки, заполненной сорбентом одного типа, размещается вторая колонка, заполненная сорбентом второго типа (например, газо-жидкостная и газоадсорбционная колонки). Газ-носитель пода-

ется из одного ввода одновременно в обе колонки, а необходимое отношение скоростей потоков, проходящих через колонки, определяется выбором размеров частиц насадки и пористостью дисковых перегородок, установленных на концах колонок. Оба метода имеют один и тот же недостаток: скорости потоков в колонках должны быть постоянными. Выполнить это требование очень сложно, поскольку на скорость потока сильно влияют любые изменения в насадках колонок, как физические (встряхивание, изменение температуры), так и химические (старение, необратимая сорбция).

15.2.3. Промышленные газы

В настоящее время методы хроматографического разделения газов, получаемых в процессе газоразделения воздуха, при производстве бытового и горючего газов, аммиака, метанола, основных продуктов переработки нефти, высококачественных чистых газов, выхлопных газов и т. д., полностью стандартизованы. Разделение проводится на одной колонке с несколькими детекторами или на нескольких колонках, каждая из которых снабжена одним «своим» детектором, а в ряде случаев эти два метода разделения объединяются. В литературе периодически публикуются сообщения о новых вариантах методики, не изменяющих, впрочем, основные ее принципы, как, например, быстрый и изотермический анализы газов с использованием одного детектора, описанные в работах [33] и [36—38]. Успешно проведено также одновременное определение газов в присутствии N_2O , SO_2 и газообразных углеводородов [28, 39].

В работе [40] опубликовано описание простого портативного газового хроматографа для анализа дымовых и подобных им газов [40], а авторы работы [41] сконструировали простой прибор для контрольных измерений концентрации оксида углерода на рабочих местах [41]. Разработаны методы, предусматривающие применение вычислительной [42] и особенно цифровой вычислительной техники [43] и микропроцессоров [44].

Разработаны интересные специальные методы определения O_3 [45] и H_2 с применением H_2 в качестве газа-носителя [46]. Изучаются проблемы, связанные с анализом чистых газов [47, 48] и жидкого O_2 [49], с определением O_2 в NH_3 [50], в H_2O [51] или в безводных растворителях, используемых в электрохимии [52]. Проведены успешные газохроматографические анализы примесей в техническом водороде [53] и в водороде, предназначенном для охлаждения больших электрических генераторов [54]. Содержание в воздухе водорода, оксида углерода и этилена было определено при помощи детектора по теплопроводности, измеряющего количества тепла, выделяемо-

го термохимической реакцией на поверхности чувствительного элемента детектора [55]. Скорость эффузии H_2 служит показателем качества сварки металлов [56]. Разработаны газохроматографические методы разделения обычных газов, содержащихся в природных минералах, предназначенные для геологических исследований.

15.2.4. Газы биологического происхождения

За основным обменом веществ часто следят, анализируя содержание O_2 , CO_2 , N_2 и паров воды [58, 59]. Иногда реакции, приводящие к образованию постоянных газов, используют для определения активности ферментов [60] или для наблюдения за развитием процесса ферментации [61]. В настоящее время большое внимание уделяется анализу летучих микрокомпонентов, содержащихся в различных газах, чаще всего в воздухе [62]. Это направление, в основу которого положены методы газовой хроматографии и масс-спектрометрии, нашло применение в медицине [63, 64] и ветеринарии [65] как средство диагностики нарушений обмена веществ.

15.2.5. Инертные газы

Для разделения инертных газов наиболее подходящими сорбентами оказались молекулярные сита [5, 66, 67]. Наибольший интерес представляет определение микроколичеств инертных газов в других газах и наоборот. Опубликованы работы, в которых рассматривается определение малых количеств криптона [68], водорода и паров воды [69, 70], а также постоянных газов [71, 72] в гелии и следов радиоактивных инертных газов в атмосфере [73].

15.2.6. Газообразные соединения азота

Применение газовой хроматографии для разделения и анализа оксидов азота дает хорошие результаты лишь в тех случаях, когда исследуемые смеси содержат только N_2O и NO , поскольку другие оксиды азота, и особенно NO_2 , отличаются значительной химической активностью. Чтобы отделение NO_2 было успешным, необходимо очень тщательно подбирать сорбенты; лучше всего его проводить на тефлоне, обработанном $NaCl$ при $320^\circ C$ [74]. В работе [75] описан метод анализа таких газовых смесей, основанный на различии в их температурах кипения [75]. Определение таких газов при давлении ниже атмосферного является практически важной задачей [76]. Путем программирования температуры колонки был успешно

выполнен анализ оксидов азота в присутствии N_2 , O_2 , CO , CO_2 , SO_2 и паров воды [77].

Со времени открытия высокой способности N_2O к захвату электронов (источник электронов ^{63}Ni) при 300—350 °C [78] была проделана большая работа по отработке методики определения N_2O с учетом его сильной адсорбции на молекулярных ситах [79]. В ряде работ описано определение N_2O в газах, выделяющихся из почвы [80], грунтовой [81, 82] и морской воды [83]. Достаточно хорошо отработаны методы анализа воздуха [79, 84] и определения фреонов в тропосфере [85] и стратосфере [86].

Определены концентрации NO [87] и NH_3 [88] в дыме сигар и сигарет. При определении содержания триметиламина в воздухе использовались концентратор — трубка, заполненная сорбентом тенакс, и хемилюминесцентный азот-селективный детектор [89]. В работе [90] рассматривается определение содержания O_2 в безводном NH_3 [90], а в работе [91] — определение содержания влаги в жидком NH_3 .

Выделение HCN часто проводится при помощи газовой хроматографии. Разработана методика его определения в продуктах сгорания [92], выхлопных газах [93] и в крови [94]. Цианид-ионы можно также определять в виде их производных в газовой фазе; указанный прием был использован для определения цианидов [96] и цианида в присутствии тиоцианатов в биологических жидкостях [97].

15.2.7. Газообразные соединения серы

За время, прошедшее с момента первого издания данной монографии, опубликовано всего несколько новых методов анализа соединений серы в промышленных газах типа бытового [98]. Для полного анализа H_2S , COS , CO_2 и SO_2 в газах и промышленных потоках углеводородных соединений необходимы три колонки и пламенно-фотометрический детектор [99, 100]. Разделение подобных газовых смесей можно проводить на насадочных колонках, наполненных особым образом обработанным порпаком QS [101]. Благодаря химической активности газообразных соединений серы при помощи детектора по электропроводности можно устанавливать содержание сероводорода, сульфидов органических соединений, меркаптанов и диоксида углерода в потоках углеводородов [102]. Чувствительность электрохимического детектора достаточно высока, чтобы можно было определять пикограммовые количества серы [103]. Для обнаружения газообразных соединений серы пригодны также термоионные [104], пьезоэлектрические [105] и хемилюминесцентные [106] детекторы. Очень часто, чтобы ус-

тановить общее количество серы в образце, всю содержащуюся в нем серу необходимо перевести в H_2S [107] или в элементную серу и использовать для обнаружения метод пламенной фотометрии [108].

Много усилий было затрачено на разработку методов определения микропримесей сероводорода и других газообразных соединений серы в чистых газах, например в этилене [109], водороде [110], диоксиде углерода [111], азоте [112] и, конечно, в воздухе [113—116]; причем содержание таких примесей часто составляет всего несколько $10^{-7}\%$.

Авторы работ [117, 118] провели определение микропримесей H_2S и CH_3SH в воздухе на предприятии по производству целлюлозы [117] и в выдыхаемом воздухе [118]. Анализ газов с применением меченых атомов требует разработки специальной методики калибровки исследуемых образцов и специальных условий их хранения. Одна из таких методик, предназначенная для определения общего содержания восстановленной серы и SO_2 на уровне $10^{-7}\%$, была создана в процессе изучения загрязненности воздуха [119]. Авторы работы [120] изучали стабильность микропримесей газообразных соединений серы в образцах газов при хранении их в алюминиевых цилиндрах под высоким давлением.

Концентрационный метод исследования является необходимым при изучении переноса (и «судьбы») серосодержащих органических газов, в частности SO_2 в воздухе, и для его практического использования должны быть разработаны достаточно чувствительные методы.

При решении этой проблемы с успехом использовался метод меченых атомов, а модельным соединением (трассером) служил SF_6 [121]; наиболее чувствительным детектором в данном случае является детектор электронного захвата (ЭЗД), позволяющий обнаруживать SF_6 в воздухе при концентрации в пределах $10^{-11}\%$ [123, 124]. Еще раньше были описаны [125] анализы смесей, образующихся при получении SF_6 (например, SF_4 , SOF_2 , S_2F_{10} , SFCl , CHF и C_2F_2) [125]. Изучение процессов окисления, приводящих к получению смесей газов с высокими концентрациями SO_2 и небольшими [126] или большими [127] концентрациями SO_3 , ускорило разработку соответствующих аналитических методов газовой хроматографии.

15.2.8. Соединения галогенов

Разделение свободных галогенов рассматривается лишь в нескольких работах. Работать с галогенами очень трудно, поскольку они отличаются высокой коррозионной способностью. В связи с возможностью получения большого числа межгалоген-

генных соединений были предприняты попытки предсказать их объемы удерживания с помощью полуэмпирического метода [128]. Согласно данным работ [133, 134], F_2 , ClF , Cl_2 , ClF_3 , ClF_5 и BgF_3 сравнительно легко разделяются при комнатной температуре на фторолубе-4 и тефлоне [129, 132]. В указанных условиях проведен анализ чистого электролитического Cl_2 [133, 134] и смеси свободного F_2 с HF [135]. В табл. 15.3 приведены величины относительного удерживания ряда газообразных соединений галогенов на колонках с кель- F [136] и силиконом 702 [137].

Таблица 15.3. Относительное удерживание некоторых соединений галогенов

Анализируемый газ	Кель- F , 60 °C [136]	Силикон 702, 48 °C [137]
Хлорид фтора	0,48	0,60
Фторид водорода	0,60	0,70
Хлор	1,00	1,00
Трифторид хлора	1,45	1,40
Пентафторид хлора	0,85	—
Бромид	2,60	2,28
Пентафторид брома	—	3,05
Моноксид хлора	1,76	—
Дioxid хлора	1,45	—
Оксифторид хлора	1,28	—
Моноксид фтора	0,40	—
Гексафторид урана	6,00	5,25

При помощи ГХ часто проводят разделение образующихся при хлорировании оксидов металлов сложных смесей, содержащих CO , CO_2 , $COCl_2$, HCl и Cl_2 [138—139]. В качестве детекторов в таких случаях рекомендуется применять никелевые детекторы по плотности (весы Мартина). Тем не менее проблема обнаружения остается нелегкой. Детектор электронного захвата, по-видимому, является наиболее чувствительным при обнаружении галогенов и их соединений, но он быстро корродируется и выходит из строя. Кулонометрический [140], аэрозольно-ионизационный [141] и микроволновый гелиевый [142] детекторы дают поддающиеся измерению сигналы при прохождении галогенов со скоростью примерно 10 $\mu\text{г/с}$. В литературе описано определение при помощи ГХ микропримесей фосгена в воздухе с использованием различных методов обнаружения: кулонометрии [143], ИК-спектроскопии и ионизации в пламени [144]. В работе [145] рассматриваются методы измерения микроконцентраций HCl в воздухе [145] и ClO_2 в газах, полученных при хлорировании [146]. В подобных условиях было с успехом проведено разделение смеси COF_2 и CO_2 [147]. Очень

важное практическое значение имеет определение микропримесей, загрязняющих галогениды водорода. Методом ГХ равновесной паровой фазы установлена концентрация CO_2 в HCl [148]. Хорошие результаты получены при анализе примесей неорганических и органических соединений в HCl [149] и безводном HF [150] на уровне 10^{-4} — $5 \cdot 10^{-4}$ об. %.

Здесь уместно упомянуть несколько работ, авторы которых исследовали загрязненность воздуха и воды галогенпроизводными углеводородами. Большой интерес представляют, в частности, результаты определения концентраций винилхлорида в воздухе, поскольку это соединение, широко используемое в промышленности для изготовления пластмасс, является канцерогеном [151, 152]. Селективное выделение винилхлорида было осуществлено на колонке с порпаком S-T [152]. В работе [153] приведен довольно полный список галогенпроизводных углеводородов, которые могут содержаться в виде микропримесей в воздухе. Чаще всего анализируются хлорпроизводные углеводородов с малой молекулярной массой [154, 155]. Как установлено, лучшим методом определения индивидуальных соединений в сложных смесях на уровне $10^{-10}\%$ является газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией. В настоящее время проводится очень интенсивная разработка методов анализа низкомолекулярных фторуглеродов в воздухе, так как считается, что под действием этих соединений разрушается слой озона в стратосфере. Чувствительность таких анализов также составляет $10^{-10}\%$ [156, 157]. Загрязненность окружающей среды летучими углеводородами в настоящее время возросла до такой степени, что эти соединения содержатся практически во всех водоемах (в концентрации порядка $10^{-7}\%$), однако пока их присутствие не приводит к нежелательным последствиям и не обнаруживается органолептически. В то же время хлорирование питьевой воды с целью ее дезинфекции вызывает образование потенциально опасных для здоровья галогенпроизводных углеводородов. По этой причине был разработан метод определения содержания в воде высоколетучих галогенпроизводных органических соединений с использованием газохроматографического метода анализа равновесной паровой фазы [158] и экстракции [159].

15.2.9. Газообразные гидриды и прочие газы

В этом разделе речь пойдет о таких газах и летучих соединениях, которые можно выделить при помощи ГХ. Ввиду относительно большого диапазона температур кипения и сильной химической активности некоторых соединений этой группы для их газохроматографического анализа требуются специаль-

ная аппаратура и оптимизация условий разделения [160]. Хотя в работе [160] рассматривается разделение хлоридов Nb, Te, Mo, Sb и Zr, использованный в ней подход может найти более широкое применение.

В настоящее время внимание хроматографистов, работающих в этой области, сконцентрировано на следующих двух направлениях: отработка методик разделения таких гидридов, как PH_3 , AsH_3 , H_2Se , GeH_4 и SnH_4 , и изучение возможности применения новых чувствительных детекторов. Авторы работы [161] провели при помощи атомно-абсорбционного детектора последовательное обнаружение гидридов As, Se, Ge и Sn в одном образце. Для определения As и Ge потребовалось всего 5 мин; концентрация первого составляла $3 \cdot 10^{-7}\%$; концентрация второго $13 \cdot 10^{-7}\%$. Объединяя ГХ и плазменно-эмиссионную спектрометрию, также можно провести удовлетворительное разделение перечисленных выше гидридов, включая SbH_3 . Изучая загрязненность воздуха и воды, авторы работы [163] при помощи чувствительного элемента в виде золотого пористого электрода измеряли токи, возникающие при реакциях с гидридами As, Sn и Sb; гидриды указанных элементов были разделены на колонке, заполненной порпаком Q. В образцах объемом 5 мл были определены As ($0,2 \cdot 10^{-7}\%$), Sn ($0,8 \cdot 10^{-7}\%$) и Sb ($0,2 \cdot 10^{-7}\%$). Анализ загрязнений, содержащихся в неорганических гидридах высокой степени чистоты, показал, что для определения микроколичеств B_2H_2 , SiH_4 , GeH_4 , AsH_3 , PH_3 , H_2S и H_2Se , содержание которых составляет 10^{-4} — 10^{-6} об. %, вполне приемлем пламенно-фотометрический детектор [164, 165]. Определение O_2 , N_2 и CO_2 в такого же типа гидридах [166], воды в гидридах германия [167] и неорганических и органических загрязнений в H_2Se [168] наглядно показывает, насколько велики возможности ГХ при анализе различных газовых смесей. Смеси GeH_4 с H_2 , CO , CO_2 , N_2 и с гидридами Si, S, As и P [169], а также смеси SiH_4 с NH_3 , HCl , H_2B_2 и с гидридами S, P, As, Ge [170] анализировались в диапазонах концентраций от 10^{-2} до 10^{-7} об. %. Большое внимание было уделено определению фосфинов [171], особенно в воздухе. Как выяснилось, для получения удовлетворительных результатов необходимо модифицировать ввод пробы в газовый хроматограф [172]. Авторы работ [173, 174] определили содержание в воздухе примесей PH_3 на химических предприятиях [173] и примесей в PH_3 и CH_2Br в кукурузном силосе [174].

Метод ГХ в сочетании с обнаружением методом атомно-абсорбционной спектроскопии используется для контроля загрязнения воздуха свинцом, источником которого является алкилсвинец [175]. Предел обнаружения алкилсвинца при этом составляет 0,04—0,09 нг, т. е. 0,1—0,3 нг/м³ при отборе пробы в

течение часа. Согласно данным работы [176], при разделении летучей хлорфенилртути на OV-17 или EGS предел обнаружения Hg^{2+} составлял 45 нг.

Теперь обратимся к некоторым основным работам по ГХ летучих неорганических хлоридов или бромидов, хотя в строгом смысле эти соединения и не являются газами. Бромиды Zr, Nb, Mo, Te, In, Sn, Bi, Sb были успешно разделены методом ГХ с программированием температуры на насадочных колонках, заполненных диоксидом кремния, обработанным KBr или CsBr; газом-носителем при этом служил азот с добавкой брома [177]. Эффективность разделения при помощи указанного метода характеризуется следующими величинами отношения коэффициентов удерживания бромидов Nb/Zr: 0,58 на диоксиде кремния и 2,66 на бромиде калия. Еще раньше авторы работы [178] сообщили о разделении многих других хлоридов и бромидов. В BCl_3 высокой степени чистоты при помощи метода ГХ было определено общее содержание углерода; предел обнаружения углерода составил 0,0011% [179]. As [180], Ge [181] и Sb [182] в рудах и сплавах различного рода и кремний в сплавах Si и Al [183] анализировались после перевода их в хлориды. Разделение хлорсиланов осуществлялось достаточно легко [184].

Определение содержания воды во многих газах и жидкостях имеет очень важное практическое значение. Примерами анализов с пределами обнаружения порядка $10^{-4}\%$ могут служить описанные в литературе анализы природного газа [185] и бутадиена-1,3 [186], органических растворителей, содержащих активный хлор и хлорид водорода [187], а также анализы жидких топлив [188]. Для снижения предела обнаружения применялись реакционная ГХ [188] или обнаружение детектором с электронным захватом [189].

15.3. Разделение изотопов и спиновых изомеров

В настоящее время интерес исследователей к этой области, по-видимому, снижается. Авторы работы [190] провели успешное разделение пара- и ортоводорода и орто- и парадейтерия на γ -оксиде алюминия при 77 К менее чем за 3 мин; газом-носителем при этом служил гелий, а роль детектора выполнял катарометр. На некоторых полимерных комплексах оснований Шинффа, обладающих как адсорбционными, так и молекулярно-ситовыми свойствами, удалось провести очень быстрое разделение водородных спиновых изомеров. На полимерном комплексе Cr(II) при комнатной температуре менее чем за 20 с были полностью разделены следующие пары: орто- и параводо-

род (протий) и орто- и парадейтерий [191]. Однако разделить пары параводород — ортодейтерий и ортоводород — парадейтерий не удалось. В работе [192] теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены некоторые характерные особенности термисторного детектора по теплопроводности, предназначенного для обнаружения орто- и параводорода.

Различие в массах газообразных изотопов с относительно малой молекулярной массой оказывает значительное влияние на энтальпию адсорбции и равновесного обмена между газовой и жидкой (или твердой) фазами со сходной химической структурой или активностью (например, $\text{NO}—\text{HNO}_3$, $\text{SO}_2—\text{H}_2\text{SO}_4$, CO — поверхность Ni).

Обогащение смеси ^{12}C и ^{13}C в CF_4 было проведено на порпаке Q при температуре от -25 до 200°C [193], а обогащение CO — на тонкоизмельченном порошке Ni (коэффициент селективности 1,037) [194]. Более тяжелые изотопы обычно концентрируются во фронтальных частях пиков. Такая же тенденция наблюдалась при обогащении смеси ^{34}S и ^{36}S в SF_6 [193, 195]. В работе [196] описано частичное разделение дейтерированных метанов при 83 K на стеклянных капиллярных колонках с шероховатой (протравленной) внутренней поверхностью; газом-носителем служила смесь $\text{He}—\text{N}_2$ [196]. Однако полного разделения (вплоть до базовой линии) в этой системе так и не удалось получить. Размытые пики получались даже в том случае, когда для улучшения свойств поверхности добавлялся N_2 , однако время удерживания при этом уменьшалось от 320 до 35 мин [197].

15.4. Анализ микроколичеств

Современные достижения в области защиты окружающей среды, химических методов диагностики болезней, исследования космоса и производства пластмасс и микроэлектронных устройств непосредственно связаны с разработкой методов микроанализа [2]. Уже опубликован ряд интересных монографий [3, 198—200] и обзоров [201, 202], в которых рассматриваются применяемые в настоящее время методы определения микроколичеств различных соединений и элементов.

ГХ с ее высокоразвитыми системами обнаружения и хорошо отработанными методиками концентрирования очень удобна как метод микроанализа. Она позволяет снизить пределы обнаружения с 0,1 об. % (как при классическом методе микроанализа) до значений порядка 10^{-7} об. %, а в некоторых случаях даже до 10^{-10} об. %. При проведении анализа газов в каждом конкретном случае необходимо тщательно рассматривать, в каких единицах выражена концентрация анализируе-

мого вещества, так как содержание газа в газообразных, жидких или твердых образцах может выражаться, как, например, объем/объем (об. %), масса/объем (мг/мл или мг/м³), объем/масса (мл/г) или масса/масса (г/г), а иногда пределы обнаружения выражаются количеством соединений, обнаруживаемых в единицу времени, как, например, масса/с или объем/с.

В принципе возможны всего три основных пути точного и высокочувствительного разделения и анализа микрокомпонентов, а именно: а) концентрирование микрокомпонента (микрокомпонентов) до уровня, достаточного для его (их) обнаружения, б) устранение всего основного вещества пробы или большей его части, в) повышение чувствительности детектора к анализируемому микрокомпоненту.

Таблица 15.4. Обзор основных направлений в анализе микропримесей

Метод	Применение	Предел обнаружения, 10 ⁴ %	Литература
<i>Концентрирование микропримесей</i>			
Статическая сорбция	Общее	0,01—0,1	151, 159, 205, 208, 211, 222, 223
Динамическая сорбция	Общее	0,001—0,1	81, 114, 204—207, 214—216
Конденсация	Специальное	1	209, 226, 227
<i>Удаление основного компонента</i>			
Химический метод	Специальное	10—1	209
Физикохимический метод	Общее	0,01—0,1	81, 82, 158, 203, 224, 228, 229, 231
<i>Повышение чувствительности детектора</i>			
Использование более чувствительных детекторов	Общее	0,001—0,1	78, 81, 89, 94, 99, 102, 103, 106, 111, 114, 124
Предварительное получение производных	Специальное	0,001—0,1	95, 119, 145, 232, 233
Система отбора пробы	Специальное	25	209

В табл. 15.4 представлены обзор методов анализа микрокомпонентов и приблизительные пределы их обнаружения. В предыдущем издании этой книги [5] высказывалось предположение, что наилучших результатов можно добиться, сочетая наиболее чувствительные аналитические методы, например хроматографическое улавливание, с обнаружением наиболее чувствительными детекторами. Опубликованные позднее работы подтверждают это предположение.

15.4.1. Концентрирование микрокомпонентов, содержащихся в газах

Концентрирование проводится обычно одним из трех следующих способов: а) путем статической сорбции жидкостью, твердым телом или газом, б) путем динамической сорбции, в) путем конденсации микрокомпонентов. Если концентрирование ве-

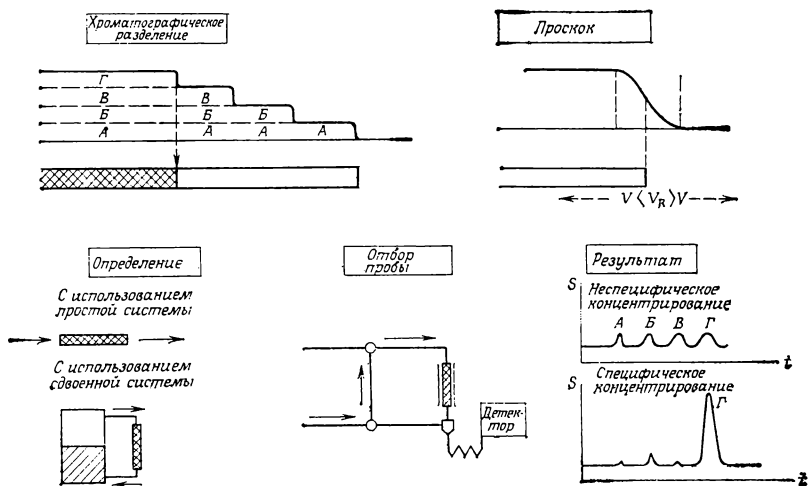


Рис. 15.2. Хроматографическое концентрирование следов газовых смесей.

дется при помощи статической сорбции, то эта жидкость экстрагирует анализируемый компонент из смеси газов. Если применяется твердое тело, микрокомпоненты концентрируются в результате адсорбции. Если для экстрагирования микрокомпонентов из жидкости или твердого тела применяется газ (метод анализа равновесной паровой фазы), экстрагированные примеси анализируются далее при помощи ГХ. Динамическое концентрирование осуществляется путем пропускания непрерывного потока смеси газов через колонку с сорбентом. Этот метод концентрирования является хроматографическим процессом (фронтальный анализ). Динамическое концентрирование можно выполнить, используя одну открытую колонку или применяя замкнутую петлю в общей системе с пробой (рис. 15.2). Третьей возможностью является концентрирование следов путем конденсации.

Очевидно, что для успешного концентрирования микрокомпонента необходимо, чтобы разность давлений паров этого микрокомпонента и собственно газа была достаточно велика. Поэтому такой метод наиболее удобен для анализа микроко-

личеств таких соединений, летучесть которых меньше летучести анализируемого газа.

При динамическом концентрировании происходит фронтальное хроматографическое концентрирование всех составляющих газовой смеси (рис. 15.2). Одно из условий полного удерживания (например, компонента Д) определяется в первом приближении объемом анализируемого газа: $V \leq V_R(1 - 2\sqrt{N})$, где V_R — объем удерживания вещества Д в системе, а N — число теоретических тарелок в колонке. Другими словами, передний фронт концентрируемого компонента должен полностью оставаться в колонке. Если газ непрерывно проходит через колонку, компонент Д выйдет из колонки в тот момент, когда $N \leq V_R(1 + 2\sqrt{N})$. Количество вещества Д, сорбированного на колонке, определяется коэффициентом распределения, который характеризует соотношение между концентрациями вещества в сорбированной и газовой фазах; коэффициент распределения можно определить по уравнению $V_R = V_G + KV_s$, где V_G и V_s — соответственно объемы газа и сорбента в колонке [203]. Самое большое преимущество динамически связанных систем состоит в том, что, если вышеуказанное условие выполняется, достаточно знать только температуру системы концентрирования, а объем газа, проходящего через колонку, фиксировать не требуется. Селективное обогащение анализируемого образца микрокомпонентом можно провести путем подбора соответствующего сорбента [204].

Хорошими примерами концентрирования методом статической сорбции могут служить описанные в работах [205, 206] определения микропримесей в гелии [205] и органических соединений в воздухе [206]. При определении содержания токсичных соединений в воздухе, концентрация которых составляла примерно $10^{-7}\%$, применяли предварительное доколонное обогащение и вводили пробу в газовый хроматограф, быстро нагревая ловушку [207—209]. Ввиду того что эта методика часто применяется при исследованиях загрязнений воздуха, авторы работы [210] сравнили эффективность различных насадок. Проведенные исследования показали, что лучшим сорбентом для улавливания органических загрязнений в газах являются пористые полимеры, и поэтому их хроматографические свойства были достаточно основательно исследованы [206, 211—213]. При определении концентрации СО в воздухе проба обогащалась примерно в 2000 раз [214]. Пробы серусодержащих газов очень часто предварительно концентрируют, после чего разделяют при помощи метода ГХ и идентифицируют [100, 215]. Таким же образом определяют примеси благородных газов [216] и N_2 в He [217]. Авторы работы [209] изучали проблему отбора представительных проб в закрытых жилых поме-

щениях с использованием статистических методов [209]. В литературе описаны осушитель для определения в полевых условиях следов влаги в атмосферных газах [218] и пассивные средства контроля влияния на организм человека содержащихся в воздухе токсичных газов [219]. Анализ содержащихся в воздухе органических соединений неизвестного состава лучше всего проводить, сочетая ГХ с масс-спектрометрией, и в этой связи представляет интерес усовершенствование программного обеспечения аппаратуры, работающей с помощью компьютеров [220]. В тех случаях, когда применение ГХ в сочетании с масс-спектрометрией по какой-либо причине не представляется возможным, очень большое значение приобретает проблема выбора стандартных образцов газов для идентификации. Проблема выбора стандартных образцов при определении состава выхлопных газов [221] представляет большой интерес в связи с исследованием окружающей среды.

В тех случаях, когда микропримеси сорбируются слабее, чем основные компоненты газа, колонки лучше заполнять твердыми, а не жидкими фазами. Обогащение все чаще проводится при помощи вытеснительной хроматографии, поскольку адсорбент блокируется большими количествами сильноадсорбируемого газа. Авторы работы [222] рекомендуют пользоваться в таких случаях именно вытеснительной хроматографией. Таким образом в 100—150 мл воздуха были с высокой точностью определены 10^{-4} — 10^{-6} об. % гелия и неона [223].

Метод анализа равновесной паровой фазы в настоящее время с большим успехом применяется для определения летучих загрязняющих примесей в биологических объектах [224]. При помощи указанного метода было определено содержание растворенных газов типа N_2O в водных системах [81, 82] и содержание CO на рабочих местах [41]. Очень хорошие результаты при исследовании загрязненности воды микропримесями органических соединений дал анализ равновесной паровой фазы с использованием ловушки в виде замкнутой петли [225]. К числу новых методов концентрирования при определении микропримесей в окружающей среде относятся криогенное обогащение [226] и совместная конденсация с легкими углеводородами типа *n*-пентана [227].

15.4.2. Количественный микроанализ при неизвестном составе матрицы пробы

Определить микропримеси газов в газовой смеси после концентрирования их одним из вышеприведенных методов сравнительно легко. Однако, если основное вещество представляет собой жидкость или твердое тело, провести количественный анализ гораздо сложнее, так как состав образца обычно до-

статочен и неизвестен. Анализ равновесной паровой фазы в этом случае может дать ошибочные количественные результаты.

При обычном процессе десорбции летучие компоненты смеси полностью переносятся из конденсированной фазы в колонку-ловушку под действием потока газа (рис. 15.3). Количество

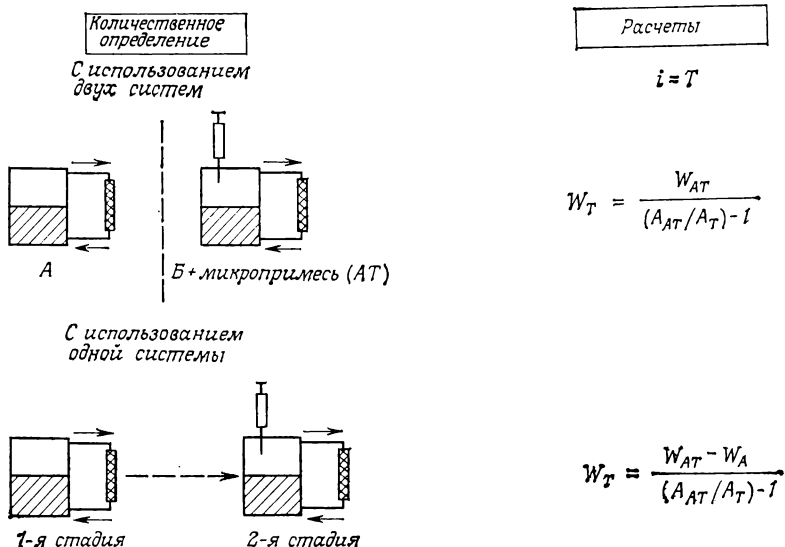


Рис. 15.3. Определение микроколичеств в динамически связанной системе (например, анализ равновесной паровой фазы).

микрокомпонента i в момент времени t (W_{it}) дается в этом случае экспоненциальной функцией [203]:

$$W_{it} = W_i \left[1 - \exp \left(- \frac{Ft}{V_G + K_{LG}V_L} \right) \right]$$

где F — объемная скорость газа-носителя, V_G и V_L — объемы соответственно газовой и жидкой фаз, а K_{LG} — коэффициент распределения. Это уравнение справедливо, если в любой момент времени концентрация микрокомпонента i в газе-носителе, входящем в колонку-ловушку, находится в равновесии с конденсированной фазой.

Все сказанное остается в силе и в том случае, если используется замкнутая петля. Однако, если циркуляция продолжается вплоть до момента выхода микрокомпонента из колонки-ловушки (см. рис. 15.2), устанавливается равновесие между

конденсированной фазой и колонкой-ловушкой. В таком случае справедливо следующее уравнение [203]:

$$W_{it} = W_i \left[\frac{K_{SG}V_S}{(V_{Gt} + K_{SG}V_S)} \frac{V_G}{K_{SG}V_S} + \frac{K_{LG}V_L}{K_{SG}V_S} + 1 \right]^{-1}$$

где V_{Gt} — мертвый объем в колонке-ловушке, V_S — объем сорбента в колонке-ловушке, K_{SG} — коэффициент распределения (отношение констант равновесия микрокомпонента в сорбенте и в циркулирующем газе при температуре колонки-ловушки). Обычно $K_{SG}V_S \gg V_{Gt}$, так что коэффициент $K_{SG}V_S(V_{Gt} + K_{SG}V_S)^{-1}$ приближается к единице. К сожалению, величина K_{LG} неизвестна, так как неизвестен состав основного вещества, а этот факт в аналитических работах часто не принимается во внимание.

Полностью исключить или по крайней мере снизить влияние «матрицы» образца на результаты определения успешно удается, используя метод стандартных добавок [228, 229]. Можно предположить, что, если к системе добавить известное количество определяемого микрокомпонента, коэффициенты распределения, в частности K_{LG} , при этом не изменятся. В этом случае не требуется знать никаких экспериментальных параметров, но по крайней мере два анализа следует провести в одинаковых условиях (рис. 15.3). Этот метод успешно применялся при исследовании загрязненности воды; количественные определения с соответствующей точностью измерения проводились при уровне концентрации $10^{-7}\%$. Метод стандартных добавок с применением замкнутой петли Гроба с ловушкой и десорбцией был успешно использован для количественного определения содержания гидрофильных примесей в воде [225].

15.4.3. Увеличение чувствительности детекторов

Все изложенное по данному вопросу в соответствующей главе предыдущего издания данной монографии [5] все еще остается актуальным. При определении концентраций микропримесей все большее распространение получают детекторы электронного захвата [78, 111, 124], масс-спектрометрия [26, 156], электрохимические [30, 103] и фотоионизационные [234, 235] методы. Разработан пламенно-ионизационный детектор, чувствительный к неорганическим газообразным соединениям [22]. Часто определяемое газообразное соединение анализируют не непосредственно, а в виде какого-либо производного, предел обнаружения которого ниже, чем у исходного соединения. Так, например, многие газы, обладающие кислотными свойствами, обрабатывают бутилатом натрия [232] и проводят обнаружение при помощи пламенно-ионизационного детектора стехио-

метрических количеств бутана или метана, выделившегося в результате реакции. Аналогично в результате реакции HCl с эпибромгидрином образуется хлорбромпропанол — соединение с тремя атомами углерода, предел обнаружения которого пламенно-ионизационным детектором достаточно мал. По-видимому, и другие химические превращения могут привести к снижению предела обнаружения ряда соединений.

Литература

1. Джеффри П., Киппинг П. Анализ газов методами газовой хроматографии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1976.
2. Hertz S., Chesler S. N. Trace Organic Analysis. A New Frontier in Analytical Chemistry. DC. Washington: Nat. Bur. Stand. Spec. Publ. No. 519.
3. Хахенберг Х., Шмидт А. Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы: Пер. с англ. — М.: Мир, 1979.
4. Анваер Б. И., Другов Ю. С. Газовая хроматография неорганических веществ. — М.: Химия, 1976.
5. Janák J. — In: Chromatography./Ed. Heftmann E. 3rd Edn. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975.
6. Девяткин Г. Г., Зорин А. Д. Летучие неорганические гидриды. — М.: Наука, 1974.
7. Guiochon G., Pommier C. Gas Chromatography in Inorganics and Organometallics. MI, Ann Arbor: Ann. Arbor Sci. Publ., 1973.
8. Rüssel H., Tölg G. Anwendung der Gaschromatographie zur Trennung und Bestimmung anorganischer Stoffe. Berlin: Springer, 1972.
9. Киселев А. В., Яшин Я. И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. — М.: Химия, 1979.
10. Другов Ю. С. Журн. анал. хим., 35, 559 (1980).
11. Janák J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 72, 606 (1959).
12. Janák J., Krejci M., Dubský H. E. Collect. Czech. Chem. Commun., 24, 1080 (1959).
13. Nestrick T. J., Stehl R. H., Driscoll J. N., Jaramillo L. F., Atwood E. C. Ind. Res. Dev., 22, 126 (1980).
14. Kyriacos G., Boord C. E. Anal. Chem., 29, 787 (1957).
15. Wilhite W. F., Hollis O. L. J. Gas Chromatogr., 6, 84 (1968).
16. Hollis O. L., Hayes W. V. — In: Gas Chromatography 1966./Ed. Littlewood A. B. London: Institute of Petroleum, 1967, p. 57.
17. Tadesse K., Smith A., Brydon W. G., Eastwood M. J. Chromatogr., 171, 416 (1979).
18. Kern H., Elser M. Microchim. Acta, 319 (1978).
19. Перцовский А. Л., Беляков В. М., Кремко Л. М. Гигиена и санитария, 7, 64 (1978).
20. Sternberg J. C., Dallaway W. S., Jones D. T. L. — In: Brenner N. Proc. 3rd Internat. Symp. GC./Eds. Brenner N., Callen J. E., Weiss M. D. New York: Academic Press, 1962, p. 231.
21. Russev P., Gough T. A., Woollam C. J. J. Chromatogr., 119, 461 (1976).
22. Bourke F. J., Dawson R. W., Denton W. H. J. Chromatogr., 19, 425 (1965).
23. Adreus F. F., Gibson E. K. Anal. Chem., 50, 1146 (1978).
24. Popp P., Oppermann G. J. Chromatogr., 148, 265 (1978).
25. Simmonds P. G. Ind. Lab., No. 1/2, 8 (1981).
26. Simmonds P. G. J. Chromatogr., 166, 593 (1978).

27. Nozoye H., Yamazaki Y., Tomita H., Someno K. *Bunseki Kagaku*, 29, T54 (1980).
28. Dürbeck H. W., Niehaus R. *Chromatographia*, 11, 14 (1978).
29. Punfor E., Tóth K., Fehér Z., Nagy G., Varadi M. *Anal. Lett.*, 8, 9 (1975).
30. Stetter J. R., Rutt D. R., Blurton K. F. *Anal. Chem.*, 48, 924 (1976).
31. Jentzsch D., Otte E. *Detektoren in der Gas-Chromatographie*, Frankfurt/M.: Akademie Verlag, 1970.
32. Terry J. O., Futrell J. H. *Anal. Chem.*, 37, 1165 (1965).
33. Andrawes F. F., Gibson E. K., Jr. *Anal. Chem.*, 51, 462 (1979).
34. Dandanea R., Hawkes S. *Chromatographia*, 13, 686 (1980).
35. Rendl T. W., Anderson J. M., Dolan R. A. *Amer. Lab.*, 12, 60 (1980).
36. Hossain M. A., Forissier M., Trambouze Y. *Chromatographia*, 9, 471 (1976).
37. Kumar A., Dua R. D., Sarkar M. K. J. *Chromatogr.*, 107, 190 (1975).
38. Barcicki J., Machowski A. *Chem. Anal. (Warsaw)*, 20, 421 (1975).
39. Сапарова С. Д., Остроушко В. И. *Заводск. лаб.*, 46, 702 (1980).
40. Miller D. L., Woods J. S., Grubauch K. W., Jordan L. M. *Environ. Sci. Technol.*, 14, 97 (1980).
41. Bauer D. — In: *Applied Headspace Gas Chromatography*/Ed. Kolb B. London: Heyden, 1980, p. 41.
42. Emery E. M. J. *Chromatogr. Sci.*, 14, 261 (1976).
43. Karasek F. W. *Ind. Res. Dev.*, 25, 28 (1974).
44. Mitchell J. D., Duranza F. C., Fuhrman P. B. *Int. Lab. No.* 11/12, 51 (1981).
45. Holland R. V., Board P. W. *Analyst (London)*, 101, 887 (1976).
46. Степаненко В. Е., Головня Э. Н. *Заводск. лаб.*, 41, 670 (1975).
47. Karlsson J. *Chromatographia*, 8, 155 (1975).
48. Дашкевич А. А., Бобрина Д. Е., Меньшикова Н. В. *Журн. анал. хим.*, 34, 550 (1979).
49. Орлова Е. С., Пилипенко Р. В., Чудович Л. Н. *Заводск. лаб.*, 42, 1178 (1976).
50. Choubey U. D., Mohan G., Mathur D. S., Ghosh E. K. *Fertil. Technol.*, 14, 125 (1977).
51. Mall K. S. J. *Chromatogr. Sci.*, 16, 311 (1978).
52. Achord J. M., Hussey C. L. *Anal. Chem.*, 52, 601 (1980).
53. Тимофеева А. Н., Алимова Т. Е., Кузьмина А. В. *Журн. анал. хим.*, 33, 2249 (1978).
54. Dear D. J. A., Dillon A. F., Freedman A. N. J. *Chromatogr.*, 137, 315 (1977).
55. Гугля В. Г. *Журн. анал. хим.*, 34, 405 (1979).
56. Pokhodnya I. K., Pal'tsevich A. P. *Avtom Svarka*, No. 1, 37 (1980).
57. Миронова О. Ф. *Журн. анал. хим.*, 33, 981 (1978).
58. Smidt U. — In: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*/Eds. Waller G. R., Dermer O. C. New York: Wiley, 1980, p. 703.
59. Janák J. — In: *Gas Chromatography in Biology and Medicine*/Ed. Porter P. London: Churchill, 1969, p. 86.
60. Noszticzus E., Kalmar D., Noszticzus Z. *Acta Chim. (Budapest)*, 103, 225 (1980).
61. Czerkawski J. W., Breckenridge G. *Anal. Biochem.*, 67, 476 (1975).
62. Sastry S. D., Buck K. T., Janák J., Dressler M., Preti G. — In: *Biological Applications of Mass Spectrometry*/Eds. Waller G. R., Dermer O. C. *Suppl.* Vol. New York: Wiley, 1980, p. 1085.
63. Jellum E. *Trends Anal. Chem.*, 1, 12 (1981).
64. Jellum E. J. *Chromatogr.*, 143, 427 (1977).
65. Hradecký P. *Thesis*. Brno: Veterinary University, 1978.
66. Thouzeau F. *Chromatographia*, 9, 506 (1976).

67. *Wilhelms L., Cejnar F. J. Radioanal. Chem., 31, 383 (1976).*
68. *Evans D. L., Mukherji A. K. Anal. Chem., 52, 579 (1980).*
69. *Резников В. Г., Кузнецова Т. С., Зорин А. Д. Журн. анал. хим., 32, 60 (1977).*
70. *Мирзаяков В. С. Заводск. лаб., 43, 664 (1977).*
71. *Aoyagi H., Takahashi M. Bunseki Kagaku, 24, 144 (1975).*
72. *Немец В. М., Петров А. А., Соловьев А. А. Журн. анал. хим., 35, 1751 (1980).*
73. *Botlino A., Lembo G., Scacco F., Sciocchetti G., Lasa J. In: Environmental Surveillance around Nuclear Installations, Vol. 1. Vienna: Intern. Atomic Energy Agency, 1974, p. 191.*
74. *Amouroux J., Rapakoulis D., Saint-Yrieix A. Analysis, 5, 372 (1977).*
75. *Тимофеев Б. Д. Журн. анал. хим., 35, 2029 (1980).*
76. *Pearsall K. A., Bonner F. T. J. Chromatogr., 200, 224 (1980).*
77. *Fujii T. Bunseki Kagaku, 28, 388 (1979).*
78. *Simmonds P. G. J. Chromatogr., 166, 593 (1978).*
79. *Punpeng T., Frohlinger J. O., Esmen N. A. Anal. Chem., 51, 159 (1979).*
80. *Smith C. J., Chalk P. M. Analyst (London), 104, 538 (1979).*
81. *Elkins J. W. Anal. Chem., 52, 263 (1980).*
82. *Hall K. C. J. Chromatogr. Sci., 18, 22 (1980).*
83. *Cohen Y. Anal. Chem., 49, 1238 (1977).*
84. *Hirota M. Bull. Chem. Soc. Japan, 51, 3075 (1978).*
85. *Tyson B. L., Arwesen J. C., O'Hara N. Geophys. Res. Lett., 5, 535 (1978).*
86. *Tyson B. L., Vedder J. F., Arwesen J. C., Brever R. B. Geophys. Res. Lett., 5, 369 (1978).*
87. *Horton A. D., Stokely J. R., Guerin M. R. Anal. Lett., 7, 177 (1974).*
88. *Brunneman K. D., Hoffmann D. J. Chromatogr. Sci., 13, 159 (1975).*
89. *Kashihira N., Kirita K., Watanabe Y., Tanaka K. Bunseki Kagaku, 29, 853 (1980).*
90. *Hunt A. D. Analyst (London), 102, 846 (1977).*
91. *Давыдова В. М., Соломенцева Е. А., Анисимов В. И. Заводск. лаб., 43, 246 (1977).*
92. *Myerson A. L., Chludzinski J. J., Jr. J. Chromatogr. Sci., 13, 554 (1975).*
93. *Fukuda N., Itoh H., Tsukamoto A., Tamri H. Bunseki Kagaku, 28, 569 (1979).*
94. *Darr R. W., Capson T. L., Hileman F. D. Anal. Chem., 52, 1379 (1980).*
95. *Funazo K., Kusano K., Tanaka M., Shono T. Anal. Lett., 13, 751 (1980).*
96. *Honna H., Suzuki K., Yoshida M., Yanashima H. Bunseki Kagaku, 28, 756 (1979).*
97. *Thomson I., Anderson R. A. J. Chromatogr., 188, 357 (1980).*
98. *Hoshika Y., Jida Y. J. Chromatogr., 134, 423 (1977).*
99. *Pearson C. D., Hines W. J. Anal. Chem., 49, 123 (1977).*
100. *Black M. S., Herbst R. P., Hitchcock D. R. Anal. Chem., 50, 848 (1978).*
101. *De Souza T. L. C., Lane D. C., Bhatia S. P. Anal. Chem., 47, 543 (1979).*
102. *Schiller R. G., Bronsky R. B. J. Chromatogr. Sci., 15, 541 (1977).*
103. *Stetter J. R., Sedlak J. M., Blurton K. F. J. Chromatogr. Sci., 15, 125 (1977).*
104. *Novotný J., Müller A. J. Chromatogr., 148, 211 (1978).*
105. *Webber L. M., Karmarkar K. H., Guilbaut G. G. Anal. Chim. Acta, 97, 29 (1978).*
106. *Kawana H., Nidaira K., Takada Y., Nakajima F. J. Chem. Soc. Jap., Chem. Ind. Sec. B., 691, 1978.*
107. *Афанасьев М. И., Денисова Л. В., Охотников Б. П., Ротин В. А., Юсфин В. С. Заводск. лаб., 41, 1203 (1975).*
108. *Бутузова А. И., Бескова Г. С., Преображенская Л. Б., Короткова Т. И. Заводск. лаб., 45, 24 (1979).*

109. Кудашева Ф. Х., План М. А., Миргалеева М. А., Истамбаева Р. А. Журн. анал. хим., 33, 1225 (1978).
110. Rath H. J., Wimmer J. Chromatographia, 13, 513 (1980).
111. Pick M. E. J. Chromatogr., 171, 305 (1979).
112. Giry L., Chaigneau M., Ricard L. P. Analusis, 6, 203 (1978).
- 113.. Фаткуллина А. Ф., Захарова Н. В., Ахметджанова Г. С., Бондаренко Л. Л. Хим. и техн. топл. масел, № 4, 15 (1979).
114. Godin J., Cluet J. L., Boudene C. Anal. Chem., 51, 2100 (1979).
115. Bruner F., Ciccioli P., Bertoni G. J. Chromatogr., 120, 200 (1976).
116. Bruner F., Ciccioli P., Di Nardo F. Anal. Chem., 47, 141 (1975).
117. Vitenberg A. G., Kuznetsova L. M., Butaeva I. L., Inshakov M. D. Anal. Chem., 49, 128 (1977).
118. Blanchette A. R., Cooper A. D. Anal. Chem., 48, 729 (1976).
119. De Souza T. L. C., Bhatia S. P. Anal. Chem., 48, 2234 (1976).
120. Kramer F. J., Wechter S. G. J. Chromatogr. Sci., 18, 674 (1980).
121. Zoccolillo I., Liberti A. J. Chromatogr., 108, 219 (1975).
122. Derks C. M. J. Chromatogr., 108, 222 (1975).
123. Thomsen L. E. Atmos Environ., 10, 917 (1976).
124. Dietz R. N., Cote E. A., Goodrich R. W. — In: Measuring Detection and Control of Environmental Pollutants. Vienna: Intern. Atomic Energy Agency, 1976, p. 277.
125. Juvet R. S., Zado F. — In: Advances in Chromatography. Vol. 1./Eds. Giddings J. C., Keller R. A. New York: Dekker, 1965, p. 249.
126. Wainwright M. S., Westerman D. W. B. Chromatographia, 10, 665 (1967).
127. Briggs J. P., Hudgins R. R., Silveston P. L. J. Chromatogr. Sci., 14, 335 (1976).
128. Otozai K., Tohyama I. Z. Anal. Chem., 279, 195 (1976).
129. Первов В. С., Суховерхов В. Ф., Подзолко Л. Г. Журн. анал. хим., 34, 2369 (1979).
130. Суховерхов В. Ф., Подзолко Л. Г., Гаранин В. Ф. Журн. анал. хим., 30, 330 (1975); 33, 1360 (1978).
131. Donokh'yu D. A., Nevitt T. D., Zletts A. V. — In: Contemporary Chemistry of Rocket Fuels./Ed. Moiseev I. I. Moscow: Atomizdat, 1972, p. 204.
132. Linch A. G., McQuacker N. R., Gurney M. Environ. Sci. Technol., 12, 169 (1978).
133. Dang S. K., Grover P. D., Chawla S. L. J. Chromatogr., 139, 207 (1977).
134. Оглоблина И. П., Новожилова И. И., Ильичева И. А. Заводск. лаб., 44, 540 (1978).
135. Foon R., Reid G. P. J. Chromatogr. Sci., 14, 421 (1976).
136. Hamlin A. G., Iveson G., Phillips T. R. Anal. Chem., 35, 2037 (1963).
137. Ellis J. F., Iveson G. — In: Gas Chromatography 1960./Ed. Scott R. P. W. London: Butterworths, 1960, p. 308.
138. Baiker A., Geisser H., Richarz W. J. Chromatogr., 147, 453 (1978).
139. Alexander G., Garzó G. Acta Chim. (Budapest), 88, 329 (1976).
140. Кричмар С. И., Левченко З. Б., Семенченко А. Е. Журн. анал. хим., 32, 1703 (1977).
141. Popp P., Grosse H.-J., Opperman G. J. Chromatogr., 147, 47 (1978).
142. Quimbly B. S., Uden P. C., Barnes R. M. Anal. Chem., 50, 2112 (1978).
143. Singh H. B., Lillian D., Appleby A. Anal. Chem., 47, 860 (1975).
144. Esposito G. G., Lillian D., Podolak G. E., Tuggle R. M. Anal. Chem., 49, 1774 (1977).
145. Bächmann K., Goldbach K., Vierkorn-Rudolph B. Mikrochim. Acta, 17 (1979).
146. Ziolkowska M., Goldowski T., Figura Z. Przem. Chem., 56, 480 (1977).
147. Агас Л. А., Добровольских Т. Ф., Шайдунов В. С. Заводск. лаб., 43, 427 (1977).
148. Rath H. J., Schmidt D., Wimmer J. Chromatographia, 12, 427 (1979).

149. Майоров В. И., Морозова Л. Н., Бондарь Г. В. Заводск. лаб., **46**, 113 (1980).
150. Cottom W. P., Stelz D. E. Anal. Chem., **52**, 2073 (1980).
151. Miller B., Kane P. O., Robinson D. B., Whittingham P. J. Analyst (London), **103**, 1165 (1978).
152. Krockenberger D., Lorkowski H., Rohrschneider L. Chromatographia, **12**, 787 (1979).
153. Harsch D. E., Cronn D. R., Slater W. R. J. Air Pollut. Control Assoc., **29**, 975 (1979).
154. Grimsrud E. P., Miller D. A. — In: Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry./Eds. Hertz H. S., Chesler S. N. DC, Washington: Nat. Bur. Stand. Spec. Publ. No. 519, 1979, p. 143.
155. Tatsukawa R., Okamoto T., Wakimoto T. Bunseki Kagaku, **27**, 164, 1978.
156. Cronn D. R., Harsch D. E. Anal. Lett., **12**, 1489 (1979).
157. Heil E., Oeser H., Hatz R., Kelker H. Z. Anal. Chem., **297**, 357 (1979).
158. Piet G. J., Slingerland P., de Grunt F. E., van den Heuvel M. P. M., Zoeteman B. C. J. Anal. Lett., **11**, 437 (1978).
159. Brass H. J. Int. Lab., **10**, No. 6, 17 (1980).
160. Rudolph J., Baechmann K. Chromatographia, **10**, 731 (1977).
161. Hahn M. H., Mulligan K. J., Jackson M. E., Caruso J. A. Anal. Chim. Acta., **118**, 115 (1980).
162. Robbins W. B., Caruso J. A. J. Chromatogr. Sci., **17**, 360 (1979).
163. Gifford P. R., Bruckenstein S. Anal. Chem., **52**, 1028 (1980).
164. Ежелева А. Е., Чурбанов М. Ф., Снопатин Г. Е., Второв В. Г. Журн. анал. хим., **33**, 317 (1978).
165. Ежелева А. Е., Снопатин Г. Е., Малыгина Л. С. Журн. анал. хим., **34**, 2308 (1979).
166. Иванова Н. Т., Вислых Н. А., Воеводина В. В., Протасова Л. А., Франгулян Л. А. Заводск. лаб., **44**, 649 (1978).
167. Девярых Г. Г., Балабанов В. В., Гусев А. В., Каратаев Е. Н., Аглиулов Н. Х. Заводск. лаб., **30**, 1630 (1975).
168. Belford R. L., Marguart J. R. Anal. Chem., **50**, 656 (1978).
169. Ежелева А. Е., Малыгина Л. С., Чурбанов М. Ф. Заводск. лаб., **45**, 978 (1979).
170. Ежелева А. Е., Малыгина Л. С., Чурбанов М. Ф. Журн. анал. хим., **35**, 1972 (1978).
171. Braunová M., Minarovič G., Blahovec B. Chem. Prům., **28**, 568 (1978).
172. Bean J. R., White R. E. Anal. Chem., **49**, 1468 (1977).
173. Vinsjansen A., Thrane K. E. Analyst (London), **103**, 1195 (1978).
174. Noak S., Reichmuth C., El-Lakwah P. Z. Anal. Chem., **291**, 121 (1978).
175. De Jonche W., Chakradorti D., Adams F. Anal. Chem., **52**, 1974 (1980).
176. Luckow V., Rüssel H. A. J. Chromatogr., **150**, 187 (1978).
177. Tsalas S., Baechmann K. Talanta, **27**, 201 (1980).
178. Otozai K., Tohyama I. Z. Anal. Chem., **274**, 353 (1975).
179. Иванова Н. Т., Пригожина Л. Д., Франгулян Л. А., Малаховский Ю. В., Журн. анал. хим., **34**, 2343 (1979).
180. Iatridis B., Parissakis G. J. Chromatogr., **122**, 505 (1976).
181. Iatridis B., Parissakis G. Anal. Chem., **49**, 909 (1977).
182. Iatridis B., Parissakis G. Anal. Chim. Acta, **89**, 347 (1977).
183. Parissakis G., Iatridis B. Chromatographia, **10**, 37 (1977).
184. Rath H. J., Schmidt D. Z. Anal. Chem., **290**, 316 (1978).
185. Юсфин В. С., Охотников Б. Ф., Ротин В. А. и др. Заводск. лаб., **41**, 542 (1975).
186. Wang W.-T., Ding X.-D., Wu X.-J. J. Chromatogr., **199**, 149 (1976).
187. Sakano T., Hori Y., Tamari Y. J. Chromatogr. Sci., **14**, 501 (1976).
188. Konopczynski A., Siedlecki A. Chem. Anal. (Warsaw), **25**, 777 (1980).

189. Scholz B., Ballschmiter K. Z. Anal. Chem., 302, 264 (1980).
190. Derichourg J. J. Chromatogr., 123, 405 (1976).
191. Riederer M., Sawodny W. J. Chromatogr., 179, 337 (1979).
192. Mitchell D. N., Le Roy D. J. Can. J. Chem., 56, 1817 (1978).
193. Bayer E., Nicholson G., Sievers R. E. J. Chromatogr. Sci., 8, 467 (1970).
194. Fetzer J. C., Bloxham P. A., Rogers L. B. Separ. Sci. Technol., 15, 49 (1980).
195. Moiseev N., Platzner I. J. Chromatogr. Sci., 14, 143 (1976).
196. Lukač S. J. Chromatogr., 166, 287 (1978).
197. Bruner F., Cartoni G. P., Possanzini M. Anal. Chem., 41, 1122 (1969).
198. Новак И. Количественный анализ методом газовой хроматографии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1978.
199. Hachenberg H. Industrial Gas Chromatographic Trace Analysis, London: Heyden, 1973.
200. Berezkin V. G., Tatarinskii V. S. Gas-Chromatographic Analysis of Trace Impurities. Plenum New York, 1973.
201. Другов Ю. С., Березкин В. Г. Усп. хим., 48, 1884 (1979).
202. Hoshika Y., Muto G. Bunseki Kagaku, 29, T10 (1980).
203. Novák J., Janák J., Golias J. — In: Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry./Eds. Hertz H. S., Chesler S. N., DC, Washington: Nat. Bur. Stand. Sepc. Publ. 519, 1979, p. 739.
204. Novák J., Vašák V., Janák J. Anal. Chem., 37, 660 (1965).
205. Aoyagi H., Takahashi M. Bunseki Kagaku, 24, 144 (1975).
206. Brown R. H., Purnell C. J. J. Chromatogr., 178, 79 (1979).
207. Melcher R. G., Caldecourt V. J. Anal. Chem., 52, 875 (1980).
208. Denyszyn R. B., Harden J. M., Hardison D. L., McGaughey J. F., Sykes A. L. — In: Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry./Eds. Hertz H. S., Chesler S. N. DC, Washington: Nat. Bur. Stand. Spec. Publ. 519, 1979, p. 153.
209. Eaton H. G., Williams F. W., Wyatt J. R., DeCorpo J. J., Saalfeld F. E., Smith D. E., King T. L. — In: Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry./Eds. Hertz H. S., Chesler S. N. DC, Washington: Nat. Bur. Stand. Sepc. Publ. 519, 1979, p. 213.
210. Vidal-Madjar C., Gonnord M. F., Benchan F., Guiochon G. J. Chromatogr. Sci., 16, 190 (1978).
211. Peterson H., Eiceman G. A., Field L. R., Sievers R. E. Anal. Chem., 50, 2152 (1978).
212. Sydor R., Pietrzyk D. J. Anal. Chem., 50, 1842 (1978).
213. Gvozдович Т. Н., Киселев А. В., Яшин Я. И. Chromatographia, 11, 596 (1978).
214. Ghosh A. K., Rajwar D. P., Bandyopadhyay P. K., Ghosh S. K. J. Chromatogr., 117, 29 (1976).
215. Walker D. S. Analyst (London), 103, 397 (1978).
216. Дашкевич А. А., Бодрина Д. Е., Меньшикова Н. В. Журн. анал. хим., 34, 550 (1979).
217. Немец В. М., Петров А. А., Соловьева А. А. Журн. анал. хим., 35, 1741 (1980).
218. Foulger B. E., Simmonds P. G. Anal. Chem., 51, 1089, 1979.
219. West P. W. Int. Lab., 10, 39 (1980).
220. Dickson L. C., Clement R. E., Betty K. R., Karasek F. W. J. Chromatogr., 190, 311 (1980).
221. Elwood J. H., Robertson D. J., Gardner D. G., Groth R. N. J. Air Pollut. Control Assoc., 26, 1158 (1976).
222. Жуховицкий А. А., Новикова Л. Г., Яновский С. М., Канунникова Е. В., Шварцман В. П. Журн. анал. хим., 30, 2251 (1975).
223. Сазонов М. Л., Лунский М. Х., Морозова С. Н. Заводск. лаб., 46, 698 (1980).

- 224. Michael L. C., Erickson M. D., Parks S. P., Pellizzari E. D. *Anal. Chem.*, **52**, 1836 (1980).
- 225. Grob K., Zürcher F. J. *Chromatogr.*, **117**, 285 (1976).
- 226. Farwell S. O., Gluck S. J., Bamesberger W. L., Shutte T. M., Adams D. F. *Anal. Chem.*, **51**, 609 (1979).
- 227. Freed D. J. — In: *Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry*./Eds. Hertz H. S., Chesler S. N. DC, Washington: Nat. Bur. Stand. Spec. Publ. 519, 1979, p. 95.
- 228. Drozd J., Novák J. J. *Chromatogr.*, **136**, 37 (1977).
- 229. Drozd J., Novák J. J. *Chromatogr.*, **152**, 55 (1978).
- 230. Drozd J., Novák J., Rijks J. A. J. *Chromatogr.*, **158**, 471 (1978).
- 231. Novák J., Goliás J., Drozd J. J. *Chromatogr.*, **204**, 421 (1981).
- 232. Сахаров В. М., Бескова Г. С., Бутузова А. И. *Журн. анал. хим.*, **31**, 250 (1976).
- 233. Равинский Л. Я., Черезова В. В. и др. *Хим. и техн. топл. масел*, **5**, 43 (1979).
- 234. Smith D. B., Krause L. A. *Amer. Ind. Hyg. Assoc.*, **39**, 939 (1978).
- 235. Driscoll J. N. *Ind. Hyg. News*, **3**, No. 1 (Mar. 1980).

Глава 16

Углеводороды

Э. Р. Адлард

16.1. Введение

Вполне естественно, что в книгу по хроматографии включена глава, посвященная хроматографии углеводородов, поскольку химики, занимающиеся углеводородами, в последние тридцать лет внесли, вероятно, значительно больший вклад в развитие газовой хроматографии, чем любая другая группа исследователей. Очень большое число исследовательских работ в этой области обусловлено тем громадным значением, которое имеет нефтяная промышленность, сложностью состава сырой нефти и получаемых из нее продуктов, а также относительной химической инертностью смесей углеводородов, весьма затрудняющей их разделение с помощью других методов. Однако именно благодаря их чрезвычайной инертности углеводороды являются идеальными объектами для хроматографии, и каждый, кто непосредственно наблюдал разделение сложной смеси углеводородов (например, бензина) на капиллярной колонке и видел полученную в течение одного часа хроматограмму, содержащую более двухсот пиков, согласится, что это, несомненно, вершина хроматографического искусства.

16.2. Газовая хроматография

Газо-твердофазную хроматографию (ГТЖ) начали применять довольно давно, и в свое время она серьезно конкурировала с газо-жидкостной хроматографией. Однако в отличие от ГЖХ с течением времени газо-твердофазная хроматография утратила свое первоначальное значение, что обусловлено целым рядом причин: ограниченностью набора доступных сорбентов, неоднозначностью их свойств от партии к партии, а также необходимостью проводить разделение при довольно высоких температурах (по сравнению с температурами кипения подлежащих разделению соединений), чтобы получить достаточно симметричные пики. Несмотря на перечисленные недостатки, газо-твердофазную хроматографию все еще применяют в некоторых особых случаях, например для определения микроколи-

честв веществ, когда режим работы усилителя, выбранный с целью обеспечить высокую чувствительность детектора, не позволяет использовать жидкие неподвижные фазы [1].

В то же время набор неподвижных жидких фаз, потенциально пригодных для ГЖХ, чрезвычайно велик. Более того, следует признать, что их число даже слишком велико, поэтому были предприняты попытки составить список «предпочтительных» фаз. Например, вряд ли целесообразно использовать в одной и той же лаборатории для разделения однотипных смесей наряду с динонилфталатом также и дидецилфталат. Приводятся серьезные доводы в пользу того, что в связи со все более широким применением капиллярных колонок, обладающих высокой разрешающей способностью, число необходимых неподвижных фаз можно свести до минимума. Однако, несмотря на всю справедливость этих аргументов, достаточно очевидно, что нельзя отказываться от применения селективных жидких фаз, поскольку даже на низкоэффективных колонках они могут в принципе обеспечить такое качество разделения, которого значительно труднее добиться при использовании неселективных фаз. Поэтому к большому огорчению рационалистов многие необычные фазы, удовлетворяющие неким конкретным нуждам практиков, будут, вероятно, сохранены.

В тех случаях, когда насадочным материалом служит предложенный Холлисом [2] пористый полимерный материал, нельзя с уверенностью сказать, к какому типу относится процесс разделения — к газо-твердофазному, к газо-жидкостному или одновременно реализуются оба принципа хроматографии. Судя по тому, что разделение протекает при высоких температурах, преобладает, по-видимому, адсорбция. Такие сорбенты пригодны для разделения сравнительно низкокипящих углеводородов и обладают тем преимуществом, что они позволяют на той же самой колонке разделить и сопутствующие газы, такие, как кислород, азот и углекислый газ [3].

Известен также класс насадок, способных абсорбировать соединения определенного типа или реагировать с ними и таким образом удалять их из смеси. В качестве примеров такого рода процессов, названных «вычитающей» хроматографией, можно привести удаление *n*-парафинов с помощью молекулярных сит с порами диаметром 5 Å, а также олефинов и ароматических углеводородов благодаря их взаимодействию с перхлоратом ртути. В последнем случае протекает необратимая химическая реакция, поэтому такой процесс вообще не имеет никакого отношения к хроматографии, однако в сочетании с хроматографическим разделением его можно использовать для того, чтобы исключить определенные компоненты из сложной смеси до ее хроматографирования. Соответствующий реагент

можно поместить либо до колонки, либо между колонкой и детектором. Пикер и Сиверс [4] описали применение хелатов лантанонидов, избирательно взаимодействующих с альдегидами, кетонами, спиртами, сложными и простыми эфирами. С помощью предколонки, содержащей такой селективный реагент, из образца удаляют указанные соединения, а смесь прошедших через колонку алканов, алкенов и ароматических углеводородов анализируют обычным образом. Последующее нагревание предколонки приводит к диссоциации комплексов и высвобождению кислородсодержащих углеводородов, которые анализируют как отдельную фракцию.

16.3. Аппаратура

Требования, предъявляемые к конструкции приборов и к характеру материалов, с которыми контактируют углеводороды в ходе разделения, в силу относительно низкой реакционной способности этих соединений менее жесткие, чем те, которые предъявляются к аппаратуре и материалам при применении хроматографии с более реакционноспособными полярными соединениями. Например, на ранних этапах развития газовой хроматографии универсальным способом введения образца являлось его впрыскивание непосредственно в колонку, однако в конце 50-х — начале 60-х гг. различные изготовители оборудования ввели в практику предколониные испарительные камеры с большой площадью поверхности и высокой теплоемкостью. Эти приспособления были признаны удачными лишь потому, что большинство хроматографистов в то время работали в области исследования нефти и занимались разделением смесей углеводородов, устойчивых в указанных условиях. В последнее десятилетие исследователи постепенно пришли к выводу, что введение образца непосредственно в колонку имеет ряд преимуществ, и вернулись к старому способу. Примерно то же можно сказать и о колонках. Первые самодельные приборы были оснащены прямыми или U-образными стеклянными колонками, позднее был налажен промышленный выпуск более компактных спиральных стальных колонок, что позволило существенно уменьшить размеры термостата. В этом случае изменения носили менее кардинальный характер: наряду со стальными колонками часто использовали также стеклянные, поскольку их достоинство — возможность непосредственного наблюдения за набивкой — оказалось более весомым, чем их недостаток — хрупкость. После двух десятилетий медленного совершенствования стеклянные капиллярные колонки заняли достойное место в аппаратном арсенале химиков-аналитиков. Их

начали применять сначала Дести [5], а затем Гроб и сотр. [6—11] и многие другие.

Среди различных типов детекторов, получивших распространение в газо-хроматографическом анализе углеводородов, наиболее важное значение имеют, несомненно, пламенно-ионизационные детекторы. Они имеют множество достоинств и практически лишены недостатков (естественно, это утверждение справедливо лишь в том случае, если детектор не имеет дефектов и правильно эксплуатируется). К числу их достоинств относятся: высокая чувствительность, широкий линейный диапазон и пропорциональность сигнала детектора числу углеродных атомов в молекуле элюируемого углеводорода. Единственный заслуживающий упоминания недостаток состоит в том, что пламенно-ионизационные детекторы не позволяют обнаруживать сопутствующие газы, поэтому они малопригодны для анализа смесей низкокипящих углеводородов, содержащих растворенные газы (в частности, воздух). Для анализа таких смесей, имеющих очень важное значение, следует использовать либо детектор по теплопроводности, либо пламенно-ионизационный детектор в сочетании с детектором по теплопроводности. Большинство фирм-производителей в настоящее время продают хроматографы, снабженные детекторами обоих типов, однако такие приборы до сих пор рассматриваются как отчасти «нестандартные», что находит отражение как в цене, так и в сроках поставки. Хотя конструкция детекторов по электропроводности и их характеристики значительно улучшены, тем не менее калибровку их необходимо проводить гораздо чаще, чем калибровку пламенно-ионизационных детекторов.

В смесях углеводородов, с которыми имеют дело в нефтяной промышленности, часто присутствует небольшое количество (от 1% и ниже) примесей, в частности серу- и азотсодержащих соединений. Для обнаружения такого рода примесей служат селективные детекторы, чувствительность которых по отношению к соединениям, содержащим гетероатомы, существенно выше, чем к углеводородам [12—14]. К числу таких детекторов относятся пламенно-фотометрический детектор (селективен по отношению к серу- и фосфорсодержащим соединениям), пламенно-термоионный детектор (селективен по отношению к азотсодержащим соединениям) и детектор по захвату электронов (обладает особенно высокой чувствительностью по отношению к некоторым полициклическим углеводородам, а также к галогенсодержащим соединениям и к тетраалкилсвинцу). Все они нашли широкое применение для анализа продуктов нефтяной промышленности.

УФ- и ИК-спектрофотометры в газовой хроматографии углеводородов практически не используют, поскольку для обнару-

жения последних с помощью таких детекторов необходимо слишком большое количество вещества. Однако газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией является, по-видимому, наиболее мощным из имеющихся в настоящее время инструментальных методов исследования сложных смесей углеводородов. Использование хроматомасс-спектрометра и компьютера, предназначенного для обработки экспериментальных данных, существенно упрощает процедуру идентификации анализируемых соединений, которая в противном случае столь трудоемка, что практически неприемлема для серийных анализов. Важной разновидностью хроматомасс-спектрометрии является метод избирательного обнаружения соединений, который заключается в том, что масс-спектрометр настраивают на режим обнаружения лишь небольшого числа ионов (обычно от одного до шести), наиболее характерных для соединений определенных типов. Например, наличие иона с массой 71 характерно для парафинов, иона с массой 91 — для неконденсированных ароматических соединений (за исключением самого бензола), с массой 141 — для метилнафталинов и т. д. При работе масс-спектрометра в таком режиме чувствительность обнаружения может повыситься в 1000 раз по сравнению с чувствительностью обнаружения в режиме сканирования. Это обстоятельство имеет немаловажное значение в тех случаях, когда осуществляется контроль уровня загрязненности окружающей среды, поскольку анализируемые образцы представляют собой, как правило, разбавленные растворы сложного состава [13, 14].

В ранних работах по газовой хроматографии разделение проводили в изотермических условиях, однако вскоре выяснилось, что эти условия приемлемы лишь для ограниченного числа углеводородов, содержащих не более пяти-шести углеродных атомов, а для углеводородов, превышающих этот диапазон, наблюдается столь сильное уширение пиков, что количественное определение этих соединений становится весьма затруднительным, особенно при их низкой концентрации. Избежать такого уширения пиков можно, как оказалось, постепенно поднимая температуру колонки в процессе разделения. В современных хроматографах предусмотрено программирование температуры, т. е. автоматическое повышение температуры с заранее заданной (как правило, постоянной) скоростью. Эта скорость зависит от природы анализируемой смеси и обычно составляет от 2 до 10 °C/мин. Впрочем, в некоторых особых случаях используют более пологий или более крутой температурный градиент. Например, на завершающей стадии анализа можно повышать температуру с большей скоростью с тем, чтобы удалить из колонки не представляющие интереса высококипя-

щие соединения. В настоящее время большинство фирм выпускает газовые хроматографы, снабженные специальным устройством для термостатирования при температурах ниже температуры окружающей среды, что существенно облегчает разделение низкокипящих соединений. Разделение сложной смеси углеводородов, температуры кипения которых различаются весьма значительно, например разделение сырой нефти, проводят при программируемом увеличении температуры колонки в общей сложности на 200—300 °С, что позволяет анализировать соединения, содержащие до 40—50 углеродных атомов.

16.4. Анализ газов

Смеси углеводородных газов обычно представлены соединениями от метана до *n*-пентана, однако в некоторых случаях они могут содержать небольшие количества углеводородов с большим числом (вплоть до восьми) углеродных атомов. Аль-Тамир и др. [15] утверждают, что из 32 возможных углеводородов C_1 — C_4 шесть термолабильны, а еще шесть можно получить только в результате синтеза. Почти все остальные 20 углеводородов были разделены этими авторами на колонке длиной 10 м с оксидом алюминия, покрытым скваланом (7,25%), при температуре 50 °С. В последующей работе [16] те же авторы показали, что использование обработанного скваланом оксида алюминия в смеси с инертным «разбавителем» (в данном случае с хромосорбом Р) позволяет увеличить проницаемость колонки и тем самым без ущерба качеству разделения существенно сократить его длительность. Эта работа, предпринятая как продолжение исследований Эггертсена и др. [17] и МакКенна и Идлемана [18], наглядно демонстрирует виртуозное владение хроматографической техникой, однако большинство смесей углеводородных газов, с которыми приходится сталкиваться на практике, имеют сравнительно простой состав, а возникающие трудности обусловлены присутствием сопутствующих газов и, как правило, не связаны с разделением собственно углеводородов.

Существуют два подхода к разделению такого рода смесей. Первый из них заключается в использовании нескольких колонок и в своем простейшем варианте сводится к серии последовательно выполняемых анализов. В несколько более сложном варианте проводится лишь однократное введение образца в хроматограф, а переключение колонок через определенные промежутки времени осуществляется либо вручную, либо автоматически. Второй подход состоит в том, что разделение смеси проводится на одной колонке с программированием температуры в очень широком диапазоне, например от —50 до +200 °С.

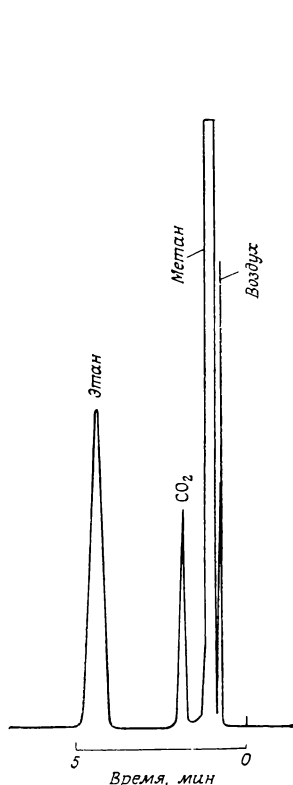


Рис. 16.1. Разделение сопутствующих и углеводородных газов на колонке с пористым полимерным сорбентом при 50°C (условия разделения см. в тексте) (рисунок из описания метода IP 337; публикуется с разрешения Института нефти).

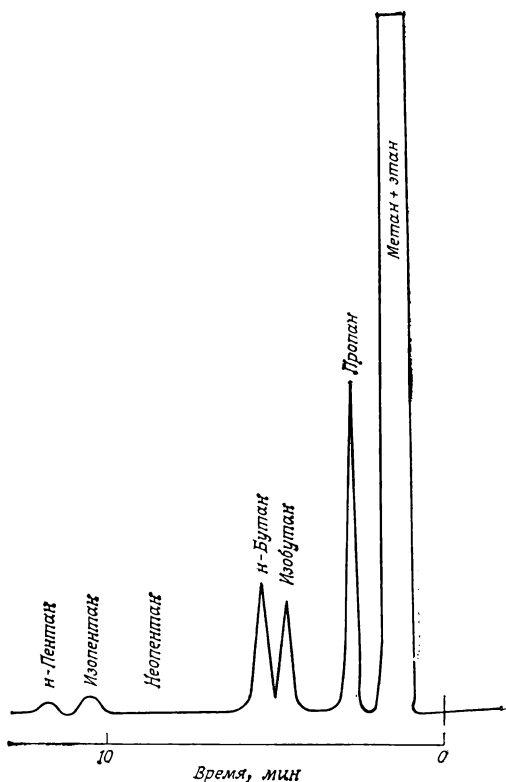


Рис. 16.2. Разделение углеводородных газов на колонке с пористым полимерным сорбентом при 140°C (условия разделения см. в тексте) (рисунок из описания метода IP 337; публикуется с разрешения Института нефти).

Иллюстрацией этих альтернативных подходов могут служить два метода, рекомендованные Институтом нефти (Великобритания). Первый метод (IP 337/78) предназначен для определения сопутствующих газов (O_2 , N_2 , He и CO_2) и предельных углеводородов от C_2 до C_5 в природном газе (т. е. в метане). Вся процедура анализа включает три этапа. Сначала образец хроматографируют на колонке размером 2 м×4 мм (внутр. диам.), наполненной сорбентом молекулярное сито 13X

(размер частиц 80—100 меш), на которой при 50°C происходит разделение смеси He , O_2 и N_2 . Остальные компоненты разделяют на колонке тех же размеров, наполненной сорбентом порapak Q (пористый полимерный адсорбент с частицами сферической формы размером 80—100 меш), при температурах 50 и 140°C (рис. 16.1 и 16.2). Для обнаружения соединений ис-

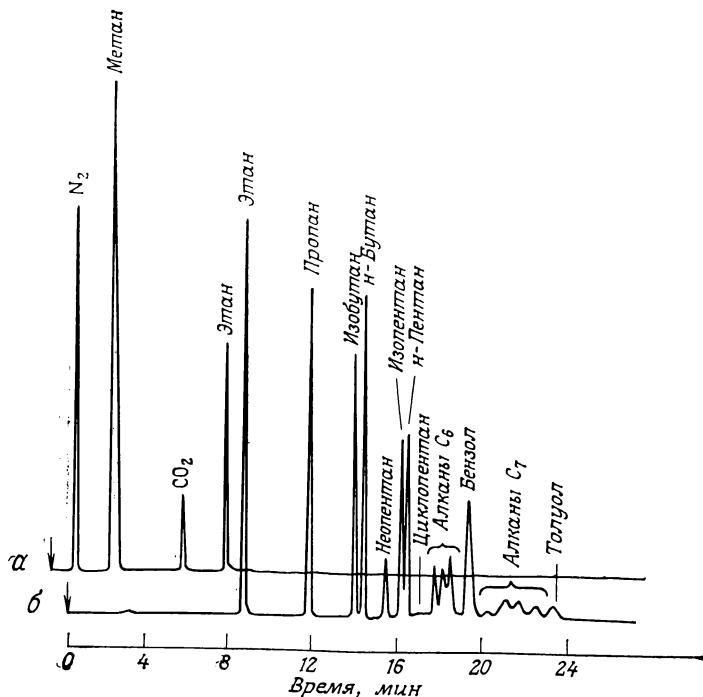


Рис. 16.3. Типичная хроматограмма природного газа [3] (с разрешения авторов).

Колонка: стальная, 3 м×2,3 мм (внутр. диам.); сорбент: порapak R; газ-носитель: гелий; температура: подъем температуры от -50 до +150°C; детекторы: детектор по теплопроводности (а) и пламенно-ионизационный детектор (б).

пользуют детектор по теплопроводности; газами-носителями служат аргон (первая колонка) и гелий (вторая колонка). Очевидно, что полный анализ весьма утомителен и отнимает много времени, однако всю эту работу можно выполнить на очень простом газохроматографическом оборудовании. Если же хроматограф снабжен устройством для программирования температуры, то два анализа на колонке с сорбентом порapak можно объединить в один, а при наличии кранов для переключения колонок весь анализ можно выполнить на одном образце, т. е. за счет усложнения оборудования можно получить су-

щественный выигрыш во времени. Некоторые фирмы могут в соответствии с чертежами заказчика изготовить хроматограф с несколькими колонками и системой их автоматического переключения, что обеспечит возможность анализа различных смесей углеводородных и сопутствующих газов.

Второй метод, который в настоящее время проходит апробацию в Институте нефти, основан на работе Стаффенса и Богарда [3]. Он предназначен для разделения смесей, содержащих O_2 , N_2 , CO_2 и алканы от C_1 до C_5 , на индивидуальные компоненты и для разделения углеводородов C_6 — C_8 в соответствии с числом углеродных атомов в их молекулах. На рис. 16.3 представлена хроматограмма смеси газов, выделяющихся из сырой нефти в результате уменьшения давления при ее извлечении из скважины. Сопоставив результаты количественного анализа этой смеси и оставшихся в жидкой фазе низкокипящих соединений, можно вычислить, какой состав имеет газовая фаза над поверхностью нефти при высоком давлении. Поскольку для обнаружения и количественного определения сопутствующих газов необходим детектор по теплопроводности, а содержание присутствующих в очень низкой концентрации углеводородов C_6 — C_8 можно определить лишь с помощью высокочувствительного пламенно-ионизационного детектора, в данном случае на выходе из колонки устанавливают (в указанной последовательности) оба детектора, а в качестве репера, позволяющего сопоставить сигналы детекторов, используют одно из соединений (например, этан или пропан), которому отвечает достаточно заметный пик на обеих хроматограммах. Разделение проводится на колонке размером $3 \text{ м} \times 2,3 \text{ мм}$ (внутр. диам.), изготовленной из нержавеющей стали и заполненной порпаком R, при программируемом подъеме температуры от -50 до $+150^\circ\text{C}$; газом-носителем служит гелий. Данный метод проще описанного выше многоколоночного, воспроизводимость и точность которого зависят от безукоризненной работы переключающих кранов, т. е. от того, насколько они герметичны и насколько строго синхронизовано их переключение с процессами хроматографического разделения, протекающими на разных колонках.

Следует отметить, что оба метода основаны на использовании газо-твердофазной хроматографии, а применяемые сорбенты — молекулярные сита и пористые полимеры — обеспечивают наилучшую воспроизводимость, поскольку их хроматографические свойства наиболее легко воспроизводимы. Впрочем, при переходе от партии к партии иногда все же наблюдается изменение характеристик даже этих сорбентов. Опубликован также ряд методик разделения углеводородных газов на других сорбентах. Например, превосходная картина разделения получена

МакТаггартом и др. [19], использовавшими в качестве сорбента гидратированный оксид алюминия (рис. 16.4). Однако в связи с тем, что для получения удовлетворительных и воспроизводимых результатов необходима высокая квалификация и богатый опыт исследователя, наметилась тенденция к ослаблению позиций методов газо-твердофазной хроматографии.

Ряд ранее разработанных методов разделения углеводородных газов основан на использовании ГЖХ, одно из немаловаж-

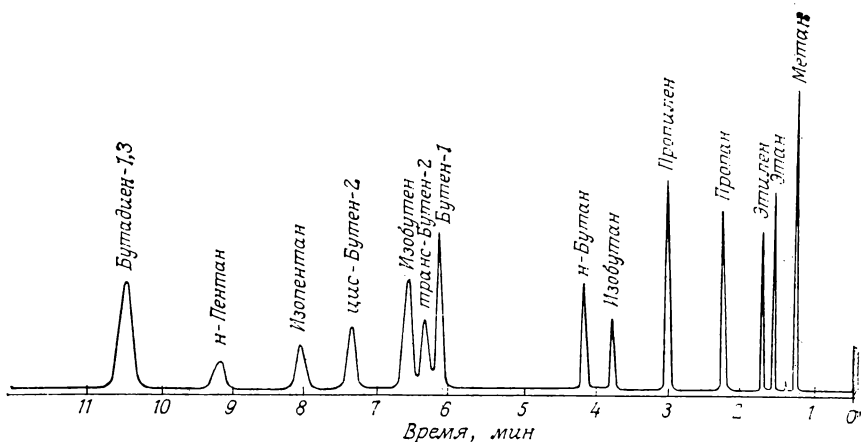


Рис. 16.4. Разделение смеси углеводородов C_1 — C_8 на колонке с гидратированным оксидом алюминия [19] (с разрешения авторов).

Хроматограф: фирмы Perkin-Elmer, модель 452; колонка: стеклянная капиллярная, $12,2 \times 0,3$ мм (внутр. диам.); сорбент: гидратированный γ -оксид алюминия; температура: 80°C ; газ-носитель: водород; давление: 0,24 МПа; пресатуратор: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ при 30°C ; деление потока: 1:500.

ных достоинств которой состоит в том, что свойства применяемых неподвижных фаз воспроизвести легче. Один из примеров разделения углеводородов с помощью ГЖХ показан на рис. 16.5 [20]. Очевидно, что, хотя достигнутое разрешение хроматографических пиков можно считать вполне удовлетворительным, тем не менее продолжительность анализа, составляющая более четырех часов, явно неприемлема. Впрочем, со времени публикации этой работы газовая хроматография достигла значительных успехов (в первую очередь это связано с интенсивным введением режима программирования температуры), поэтому вполне вероятно, что длительность разделения на такого рода неподвижных фазах можно существенно сократить. В связи с этим не исключено, что ГЖХ как метод анализа углеводородных газов окажется предпочтительнее газо-твердофазной хроматографии и постепенно вытеснит последнюю.

Наиболее трудной задачей, с которой приходится сталкиваться в ходе анализа смесей углеводородных газов, является обычно не собственно разделение, а калибровка детекторов. Чтобы откалибровать детектор, необходимо приготовить смеси газов известного состава. Это можно сделать либо с помощью гравиметрического метода, либо основываясь на значениях парциального давления каждого из компонентов, которые по-

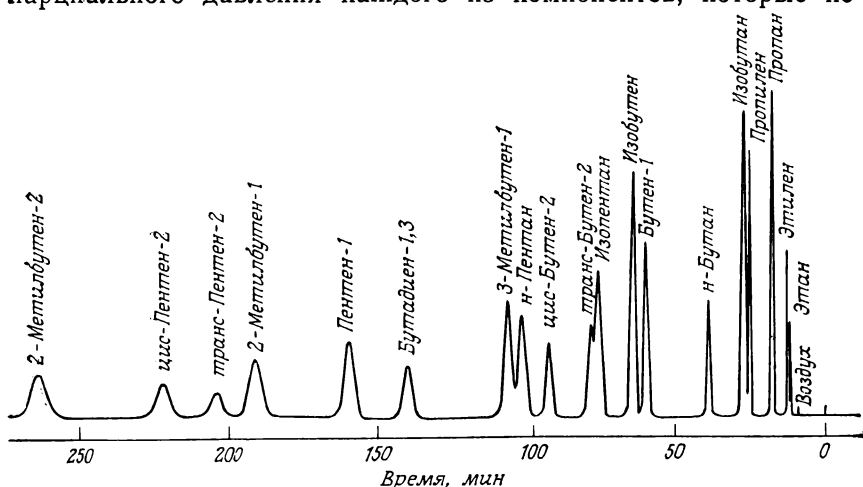


Рис. 16.5. Разделение смеси углеводородов C_2 — C_8 на колонке длиной 15,24 м с диметилсульфолом при $0^\circ C$ [20] (с разрешения авторов).

следовательно вводят в предварительно вакуумированный сосуд. Второй метод, безусловно, проще, однако не отличается высокой точностью, поскольку при вычислении состава смесей приходится пользоваться приближенными уравнениями состояния неидеальных газов. Более точным, хотя и более трудоемким, является гравиметрический метод. Взвешивание необходимо проводить с особой тщательностью, так как в любом случае масса контейнера примерно на три порядка больше, чем масса любого из смешиваемых газов. Независимо от способа приготовления смесь следует выдержать в течение нескольких дней (лучше при механическом перемешивании) с тем, чтобы установилось равновесие, поскольку вопреки весьма распространенному убеждению смешение газов протекает отнюдь не слишком быстро. Если необходимо, чтобы содержание определенных компонентов составляло десятитысячные доли процента, нельзя пользоваться заранее приготовленными смесями, потому что вследствие адсорбции на поверхности стенок сосуда концентрация этих компонентов может уменьшиться в непред-

сказуемое число раз. В таких случаях смесь готовят непосредственно перед употреблением путем динамического разбавления заранее приготовленного образца, причем, как правило, разбавление проводится в две, а чаще в три стадии.

16.5. Смеси летучих жидких углеводородов

Типичным примером такой смеси служит бензин. Интервал температур кипения компонентов этой сложной смеси, содержащей насыщенные углеводороды, олефины и ароматические соединения, чрезвычайно широк: от -42 (пропан) до примерно 216°C (*n*-додекан). К такого же рода смесям относятся продукты переработки лигроина и смеси олефинов, которые служат сырьем для нефтехимической промышленности, используемые в качестве растворителей смеси насыщенных углеводородов, а также технически чистые соединения типа толуола и ксилола. Именно на примере такого рода смесей наиболее отчетливо проявляются широкие возможности метода газовой хроматографии. Разделение жидких углеводородов можно проводить либо на неселективных колонках высокого разрешения, либо на селективных колонках с более низкой разрешающей способностью. В ряде случаев целесообразно объединять, например, насадочные колонки низкого разрешения и капиллярные колонки или применять целый набор насадочных колонок, соединенных друг с другом посредством кранов. Система нескольких последовательно соединенных колонок разных типов может оказаться необходимой при проведении анализа смесей углеводородов с кислородсодержащими соединениями (спиртами и эфирами), используемых в настоящее время (пока еще в рамках проводимого в ряде стран эксперимента) в качестве топлива для двигателей внутреннего сгорания.

Метод рутинного анализа бензиновых фракций, основанный на использовании длинных (от 50 м и длиннее) капиллярных колонок высокого разрешения, был впервые предложен Сандерсом и Мейнардом [21], а затем получил дальнейшее развитие в работах Виттемора [22], Адларда и др. [23] и Шульца и др. [24]. Все эти исследователи в качестве неподвижной фазы выбрали сквалан, поскольку на этой неподвижной фазе достигается наилучшее разделение низкокипящих углеводородов, а также в силу наличия обширной информации об идентификации компонентов сложных смесей, анализируемых на колонках со скваланом. Однако сквалан обладает и серьезным недостатком: на этой фазе нельзя работать при температуре выше 100°C и как следствие в дополнение к программированию температуры приходится прибегать к программированию скорости потока газа-носителя.

Таблица 16.1. Воспроизводимость результатов измерения площади пиков, отвечающих некоторым компонентам бензина (представлены результаты обработки 42 хроматограмм) [23]

Углеводород	Относительная площадь пика, %	Стандартное отклонение	Относительная ошибка, %
Изобутан	1,56	0,110	7,05
Изобутен+бутен-1	0,555	0,028	5,12
Изопентан	1,889	0,046	2,44
2,2-Диметилбутан	0,382	0,010	2,62
3-Метилпентан+этилбутен-1	2,89	0,042	1,42
<i>цис</i> -3-Метилпентен-2+ <i>цис</i> -гексен-2	4,84	0,080	1,65
Метилциклопентан	2,63	0,091	3,46
Бензол	7,90	0,100	1,27
3-Метилгексан	3,29	0,035	1,07
<i>цис</i> -1,2-Диметилциклопентан	0,223	0,006	2,65
2,5-Диметилгексан	0,812	0,020	2,36
Толуол	10,72	0,170	1,58
2,2-Диметил-3-этилпентан+ +2-метил-4-этилгексан	0,149	0,010	6,37
1,3,5-Триметилбензол	0,296	0,011	3,83
<i>n</i> -Пропилбензол	0,410	0,020	4,87
1,2,3-Триметилбензол	0,771	0,024	3,15
1,3-Диметил-5-этилбензол	0,330	0,018	5,44
1,4-Диметил-2-этилбензол	0,160	0,007	4,37
<i>втор</i> -Бутилбензол	0,116	0,005	4,38

Таблица 16.2. Воспроизводимость результатов измерения времени удерживания некоторых компонентов бензина (представлены результаты обработки 42 хроматограмм) [23]

Углеводород	Среднее время удерживания, с	Стандартное отклонение	Относительная ошибка, %
Изобутан	462,5	3,47	0,75
Изобутен+бутен-1	485,2	3,45	0,71
Изопентан	673,9	4,96	0,74
2,2-Диметилбутан	899,4	5,11	0,57
3-Метилпентан+этилбутен-1	1140,1	5,92	0,52
<i>цис</i> -3-Метилпентен-2+ <i>цис</i> -гексен-2	1236,9	5,43	0,43
Метилциклопентан	1370,3	5,75	0,42
Бензол	1429,6	6,08	0,43
3-Метилгексан	1685,2	5,82	0,35
<i>цис</i> -1,2-Диметилциклопентан	1948,1	5,66	0,29
2,5-Диметилгексан	2032,6	8,58	0,42
Толуол	2115,7	6,48	0,30
2,2-Диметил-3-этилпентан+ +2-метил-4-этилгексан	2487,7	6,20	0,25
1,3,5-Триметилбензол	2612,4	6,88	0,26
<i>n</i> -Пропилбензол	3261,0	11,04	0,33
1,2,3-Триметилбензол	3533,6	10,56	0,30
1,3-Диметил-5-этилбензол	3952,5	12,85	0,33
1,4-Диметил-2-этилбензол	4431,4	16,44	0,37
<i>втор</i> -Бутилбензол	5470,4	23,64	0,43

Таблица 16.3. Точность количественного определения компонентов смеси известного состава [23]

Углеводород	Время удерживания, с	Относительная площадь пика, %	Относительное содержание масс. %
1. 2-Метилбутан	656	10,59	10,41
2. Пентен-1	676	0,64	0,71
3. <i>n</i> -Пентан	739	1,23	0,92
4. <i>транс</i> -Пентен-2	744	0,63	} 0,99
5. <i>цис</i> -Пентен-2	} 756	0,42	
6. 3,3-Диметилбутен-1		0,05	0,16
7. 2-Метилбутен-2	790	3,06	0,03
8. 2,2-Диметилбутан	867	0,17	3,05
9. 4-Метилпентен-1	926	1,01	0,20
10. Циклопентан	984	3,94	1,09
11. 2,3-Диметилбутан	1005	7,15	3,77
12. 2-Метилпентан	1028	0,31	6,38
13. 2-Метилпентен-1	1076	1,12	0,42
14. Гексен-1	1087	0,46	1,10
15. 2-Этилбутен-1	1139	0,14	0,53
16. <i>транс</i> -Гексен-2	1165	0,26	0,98
17. 2-Метилпентен-2	1171	1,25	<i>цис/транс</i> 0,37
18. <i>n</i> -Гексан	1181	} 0,58	1,26
19. 4,4-Диметилпентен-1	} 1195		0,17
20. <i>цис</i> -3-Метилпентен-2		} 0,38	<i>цис/транс</i>
21. <i>цис</i> -Гексен-2	—		
22. <i>транс</i> -3-Метилпентен-2	1246	0,10	0,22
23. Метилциклопентан	1305	} 0,38	0,25
24. 2,3-Диметилбутен-2	1309		0,60
25. 2,4-Диметилпентан	1335	1,35	1,42
26. Бензол	1358	} 1,10	0,49
27. 2,2,3-Триметилбутан	} 1374		0,58
28. 2,4-Диметилпентен-1		1404	0,11
29. 2,4-Диметилпентен-2	1412	0,48	0,51
30. 3-Метилгексен-1	1437	0,13	0,18
31. <i>транс</i> -2-Метилгексен-3	1446	0,38	0,43
32. 5-Метилгексен-1	} 1494	1,43	0,13
33. 4-Метилгексен-1			1,33
34. Циклогексан	} 1563	0,44	0,27
35. 2,3-Диметилпентан			0,45
36. 1,1-Диметилциклопентан	1597	0,31	0,37
37. 3-Метилгексан	1609	0,15	0,16
38. 2-Метилгексен-1	1617	0,16	0,42
39. <i>цис</i> -1,3-Диметилциклопентан	1632	0,38	<i>цис/транс</i> 0,45
40. Гептен-1	} 1645	} 0,39	} 0,18
41. <i>транс</i> -1,3-Диметилциклопентан			
42. <i>цис</i> -2,5-Диметилгексен-3	1649	} 0,38	0,13
43. 3-Этилпентан	1657		0,43
44. <i>транс</i> -1,2-Диметилциклопентан	} 1665	0,34	<i>цис/транс</i> 0,06
45. <i>транс</i> -Гептен-3			1679
46. 2,2,4-Триметилпентан	} 1679	0,21	0,37
47. <i>цис</i> -Гептен-3			<i>цис/транс</i> 0,11
48. 2-Метилгексен-2	1686		

Продолжение табл. 16.3.

Углеводород	Время удерживания, с	Относительная площадь пика, %	Относительное содержание, масс, %
49. <i>транс</i> -2,5-Диметилгексен-3	1712	0,17	0,20
50. <i>транс</i> -Гептен-2	1730	} 1,91	0,03
51. <i>н</i> -Гептан	1739		1,78
52. <i>цис</i> -Гептен-2	1753	0,28	0,96
			<i>цис/транс</i>
53. <i>цис</i> -1,2-Диметилциклопентан	1840	0,02	—
54. Метилциклогексан	1867	0,78	0,83
55. 2,5-Диметилгексан	1899	0,29	0,41
56. 2,4-Диметилгексан	} 1920	0,44	0,06
57. Этилциклопентан			0,42
58. 2,3-Диметилгексен-1	1960	0,23	0,30
59. <i>транс</i> -2-Метилгептен-3	1976	0,10	0,11
60. Толуол	1993	5,77	4,90
61. 2,5-Диметилгексен-2	2025	0,17	0,20
62. 2,3,4-Триметилпентан	2030	0,15	0,14
63. 2,3-Диметилгексан	2081	0,16	0,19
64. 2-Метилгептан	2110	0,26	0,32
65. 4-Метилгептан	2123	0,12	0,13
66. 3,4-Диметилгексан	2141	0,20	0,24
67. 3-Метилгептан	} 2153	0,21	0,18
68. 3-Этилгексан			0,06
69. 2-Метилгептен-1	} 2176	0,26	0,06
70. 2,2,5-Триметилгексан			0,25
71. Октен-1	2205	0,30	0,38
72. <i>транс</i> -1,4-Диметилциклогексен	} 2228	} 1,04	0,41
73. <i>цис</i> -1,3-Диметилциклогексен			0,61
			<i>цис/транс</i>
74. 1,1-Диметилциклогексан	2236	}	0,37
75. 2-Метилгептен-2	2256		0,10
76. <i>транс</i> -Октен-2	2301	0,13	0,64
			<i>цис/транс</i>
77. <i>н</i> -Октан	} 2308	} 4,82	3,77
78. <i>транс</i> -1,2-Диметилциклогексен			0,42
79. <i>цис</i> -Октен-2	2325	}	—
80. <i>транс</i> -1,3-Диметилциклогексен	} 2344		—
81. <i>цис</i> -1,4-Диметилциклогексен	} 0,56	0,43	
82. 2,4-Диметилгептан		2430	1,02
83. 2,6-Диметилгептан	2465	0,44	0,63
84. <i>цис</i> -1,2-Диметилциклогексен	2486	} 0,74	0,70
85. 2,5-Диметилгептан	2497		0,16
86. Этилбензол	2526	7,52	6,53
87. 1,4-Диметилбензол	2608	2,15	2,11
88. 1,3-Диметилбензол	} 2622	} 3,49	2,43
89. 2,3-Диметилгептан			0,70
90. 3,4-Диметилгептан	2641	0,25	0,25
91. 4-Метилдоктан	2668	} 0,93	0,13
92. 2-Метилдоктан	2678		0,81
93. 3-Метилдоктан	2710	0,19	0,19
94. 1,2-Диметилбензол	2733	3,64	3,21
95. Нонен-1	2773	0,55	0,62
96. Изопропилбензол	} 2877	} 4,47	0,65
97. <i>н</i> -Нонан			3,48

Продолжение табл. 16.3.

Углеводород	Время удерживания, с	Относительная площадь пика, %	Относительное содержание, масс. %
98. <i>n</i> -Пропилбензол	3046	2,56	2,52
99. 3-Этилтолуол	3133	0,10	0,08
100. 4-Этилтолуол	3147	0,16	0,14
101. 2-Этилтолуол	} 3240	} 0,21	0,15
102. 5-Метилнонан			0,07
103. 4-Метилнонан	3251	0,15	0,13
104. 2-Метилнонан	} 3275	} 1,21	0,49
105. 1,3,5-Триметилбензол			0,94
106. <i>трет</i> -Бутилбензол	3305	0,29	0,31
107. 3-Метилнонан	3323	0,22	0,19
108. 1,2,4-Триметилбензол	3410	2,52	1,78
109. Децен-1	} 3461	} 0,41	0,25
110. Изобутилбензол			0,22
111. <i>втор</i> -Бутилбензол	} 3567	} 1,32	0,23
112. <i>n</i> -Декан			1,39
113. 1,2,3-Триметилбензол	} 3625	} 1,21	1,23
114. 4-Изопропилтолуол			0,11
115. Индан	3647	0,49	0,52
116. 1,3-Диэтилбензол	3801	0,29	0,28
117. <i>n</i> -Бутилбензол	3868	0,59	0,65
118. 4- <i>n</i> -Пропилтолуол	3906	0,27	0,21
119. 4-Метилдекан	4178	0,16	0,14
120. 2-Метилдекан	4233	0,27	0,25
121. 3-Метилдекан	4303	0,05	0,07
122. <i>n</i> -Ундекан	4729	0,76	0,91
123. 1,2,4,5-Тетраметилбензол	4780	0,51	0,51
124. 1,2,3,5-Тетраметилбензол	4869	0,26	0,24
125. 1,2,3,4-Тетраметилбензол	5284	0,08	0,08
126. Нафталин	5578	0,09	0,10

Предпринятые Американским обществом по испытанию материалов в США и Институтом нефти в Великобритании попытки стандартизовать методы капиллярной хроматографии с тем, чтобы их можно было применять для количественного анализа бензинов, до сих пор не увенчались успехом, что обусловлено плохой воспроизводимостью результатов. Вместе с тем достаточно очевидно, что в пределах одной лаборатории можно добиться вполне приемлемой точности и воспроизводимости результатов анализа. Справедливость этого утверждения подтверждают представленные в табл. 16.1—16.3 [23] данные о точности результатов анализа бензина. Хуже всего воспроизводятся результаты измерения площади пиков, отвечающих либо очень летучим соединениям, например изобутану, либо таким соединениям, содержание которых очень мало, например

2,2-диметил-3-этилпентану (табл. 16.1). Замена стальных и стеклянных колонок на кварцевые, возможно, позволит улучшить воспроизводимость, однако вряд ли это будет кардинальным решением проблемы, поскольку основным источником ошибок являются, вероятно, в первую очередь система ввода образца и затем системы обнаружения и обработки данных. Более простые методики анализа с применением капиллярных колонок стандартизованы (например, Американским обществом по испытаниям материалов стандартизован метод анализа высокочистых н-гептана и изооктана, известный под шифром D 2268).

Основной недостаток методики анализа сложных смесей углеводородов на капиллярных колонках со скваланом — ее продолжительность, что, как уже отмечено выше, обусловлено узостью рабочего диапазона температур, допустимых для данной неподвижной фазы. На рис. 16.6, иллюстрирующем сказанное, приведены результаты анализа бензина на такой колонке. Основная масса компонентов смеси выходит из колонки в течение 60 мин, а для элюирования более высококипящих соединений, главным образом ароматических, необходимо еще 40 мин. Это ограничение по температуре послужило причиной поисков таких фаз, которые при столь же хорошей разрешающей способности позволили бы работать при более высоких температурах [25—28], однако эти поиски пока к успеху не привели и сквалан все еще остается наилучшей неподвижной фазой.

Для разделения и количественного определения только ароматических углеводородов можно использовать как насадочные, так и капиллярные колонки, а в качестве неподвижных фаз — полярные жидкости типа 1,2,3-трис(2-цианоэтокси)пропана или полиэтиленгликоля 400. С этих фаз в первую очередь элюируются предельные углеводороды и олефины (практически не разделяются), а затем ароматические соединения, которые хорошо отделяются друг от друга (рис. 16.7).

В результате использования селективных неподвижных фаз тиодипропионитрила и смеси перхлората ртути с хлорной кислотой, позволяющих соответственно отделить ароматические соединения от насыщенных углеводородов и олефинов и удалить из смеси олефины, Мартин [29] разделил бензин на три основные фракции: предельные, непредельные и ароматические углеводороды, т. е. добился результатов, равноценных получаемым с помощью жидкостной хроматографии с флуоресцентными индикаторами (см. разд. 16.9). Этот метод был усовершенствован Робинсоном и др. [30] и Ставинола [31], однако он не завоевал широкой популярности, что отчасти обусловлено довольно неприятными свойствами перхлората ртути, который

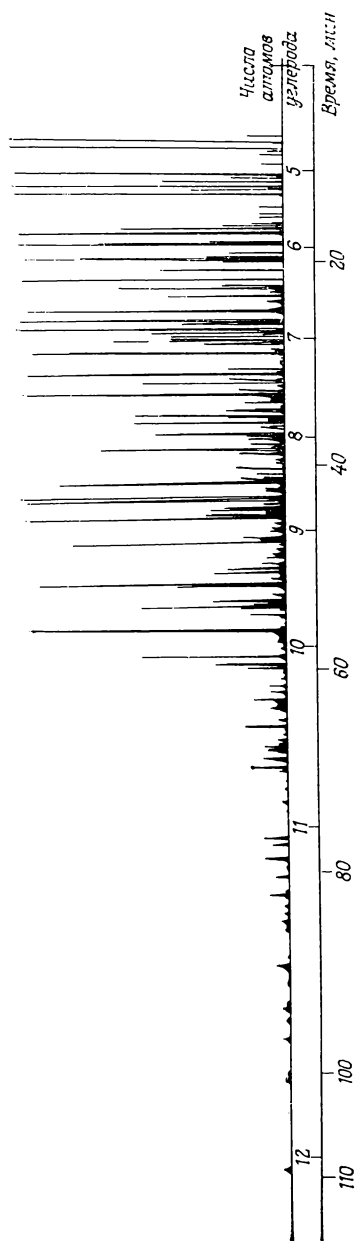


Рис. 16.6. Хроматограмма бензина.

Колонка: стальная, 70 мХ0,25 мм; неподвижная фаза: сквалан; температура: подьем температуры от 0 до 95°C со скоростью 2°C/мин; газ-носитель: гелий; давление: от 0,1 до 0,45 МПа; объем образца: 0,5 мкл; деление потока: 1:50.

хорошо поглощает воду и превращается в твердую цементобразную массу, отличающуюся низкой проницаемостью. Еще одна проблема состоит в том, что разделяемые соединения адсорбируются на поверхности твердой фазы, выполняющей роль носителя для перхлората.

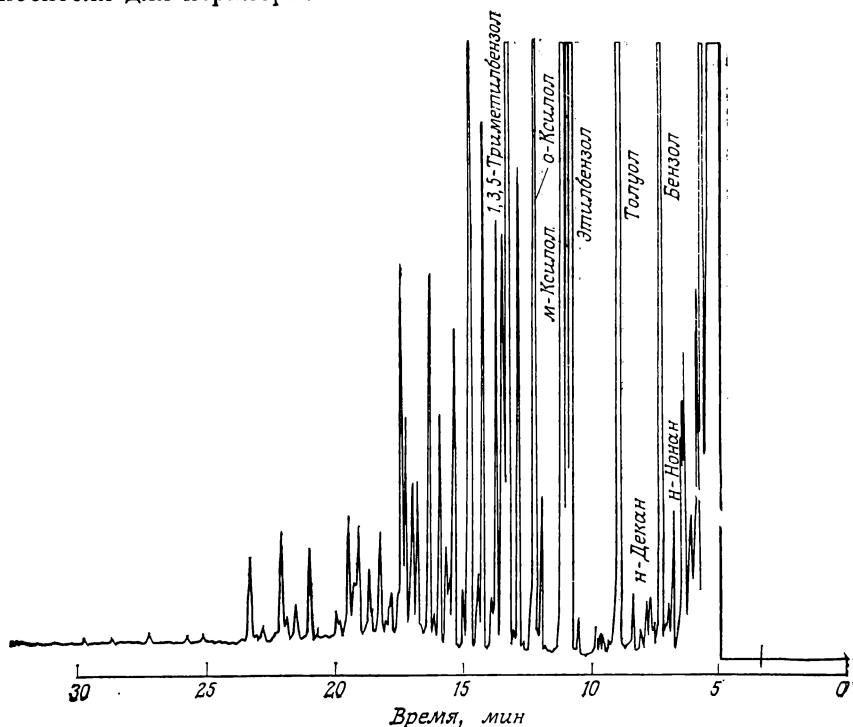


Рис. 16.7. Разделение присутствующих в бензине ароматических углеводородов.

Колонка: кварцевая, 50 м×0,2 мм; неподвижная фаза: полиэтиленгликоль 400; температура: 6 мин при 50 °С и последующее увеличение до 110 °С со скоростью 10 °С/мин; газ-носитель: гелий; давление: 0,2 МПа; объем образца: 0,5 мкл; положение делителя потока: 1:100.

Другой метод, нашедший более широкое применение (в особенности для анализа нефтехимического сырья), позволяет разделить продукты переработки нефти с температурой кипения вплоть до 200 °С на фракции парафинов, нафтенов и ароматических углеводородов. Помимо колонки с полярным сорбентом, предназначенной для отделения ароматических соединений от ненасыщенных углеводородов, используют колонку с адсорбентом молекулярное сито 13X. Этот адсорбент отличается следующей особенностью: углеводороды с одинаковым числом углеродных атомов в молекуле элюируются из колонки в

виде двух дискретных пиков, один из которых отвечает парафинам, а другой — нафтенам. В целом методика анализа довольно сложна и включает целый ряд операций, в том числе извлечение образца из ловушки, изменение направления потока и переключение колонок через определенные промежутки времени. Институтом нефти опубликовано подробное описание методики анализа (IP, метод 321/77); соответствующее газохроматографическое оборудование в настоящее время имеется в продаже.

Еще на раннем этапе развития газовой хроматографии отделение олефинов от парафинов проводилось на неподвижных фазах, содержащих соли серебра [32]. Наибольшее распространение получил раствор нитрата серебра в глицерине, хотя, как отмечено в работе [33], активную роль в процессе разделения играют ионы Ag^+ , и поэтому более эффективны водные растворы. Однако использование водных растворов накладывает очень жесткие ограничения на диапазон рабочих температур и, следовательно, на предельную величину молекулярной массы разделяемых соединений, которая должна лежать в пределах 80—100, т. е. должна отвечать углеводородам с 6—7 углеродными атомами в молекуле.

Интересной особенностью неподвижных фаз, содержащих нитрат серебра, является их способность разделять обычные и дейтерированные углеводороды [33, 34]. В работах [35, 36] описано также разделение олефинов с использованием других комплексов металлов; этим же вопросам посвящен исчерпывающий обзор [37]. Авторы работ [38, 39] провели разделение сложных смесей олефинов на капиллярных колонках с высокой разрешающей способностью. В работе [40] описано применение оптически активных комплексов родия для разделения дейтерированных этиленов, а также энантиомеров циклических олефинов, содержащих асимметрические центры.

16.6. Смеси углеводородов керосиновых и газойлевых фракций

Керосин и газойль кипят при температурах примерно от 100 до 380 °C, т. е. в их состав входят углеводороды C_7 — C_{24} , которые нельзя разделить с помощью вышеописанных методов газовой хроматографии. Ряд методик, применяемых для разделения таких углеводородов, например разделение *n*-парафинов на колонках с молекулярными ситами 5 Å, не являются чисто хроматографическими. Хотя в рамках одного эксперимента полный анализ керосиновых и газойлевых фракций практически неосуществим, тем не менее разделение этих смесей в со-

ответствии с температурами кипения их компонентов может быть вполне успешным, особенно если его проводить на капиллярных колонках, используя в качестве неподвижной фазы метилсиликон. На рис. 16.8 представлена хроматограмма, полученная при разделении фракции сырой нефти, кипящей при температуре ниже 343°C , на капиллярной кварцевой колонке $50 \text{ м} \times 0,2 \text{ мм}$ (внутр. диаметр) с метилсиликоном SP-2100. Небольшой пик, расположенный точно посередине между пиками,

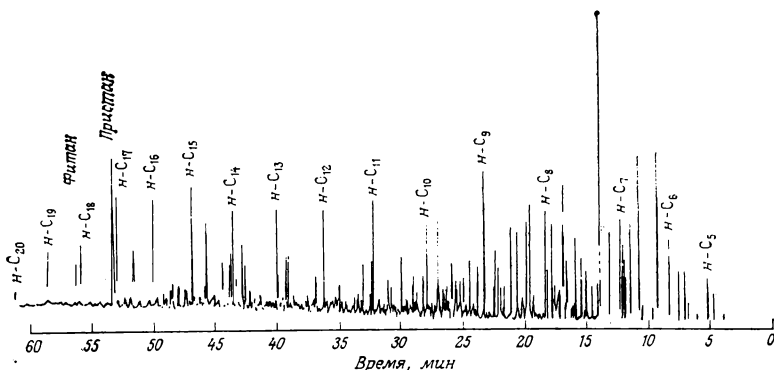


Рис. 16.8. Разделение фракции светлой нигерийской сырой нефти, кипящей при температуре $< 343^{\circ}\text{C}$.

Колонка: кварцевая, $50 \text{ м} \times 0,2 \text{ мм}$; неподвижная фаза: метилсиликон SP-2100; температура: 3 мин при 0°C и последующие увеличения температуры до 275°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; газ-носитель: гелий; скорость потока: $0,8 \text{ мл}/\text{мин}$; объем образца: 1 мкл; деление потока: 1:200.

отвечающими *n*-гептадекану и пристану, и два пика, расположенные между пиками *n*-октадекана и фитана, не заслуживают особого внимания. Пристан и фитан (соответственно 2,6,10,14-тетраметилпентадекан и 2,6,10,14-тетраметилгексадекан) — важнейшие представители группы изопреноидных углеводородов; их присутствие в сырой нефти не только представляет интерес для геохимиков и биологов, но и позволяет достаточно надежно идентифицировать каждую партию нефти, поскольку при переходе от одного месторождения к другому относительное содержание этих соединений меняется в широких пределах.

Хотя в отличие от бензиновой фракции разделить газойлевую фракцию на отдельные компоненты не представляется возможным, аналитику часто удается достаточно обстоятельно ответить на те вопросы, которые задает ему химик-технолог или инженер, занимающийся решением некой конкретной задачи. При помощи современных компьютеров не составляет труда сгруппировать данные газохроматографического анализа любым заранее заданным способом, с тем чтобы представить их

в наилучшей для интерпретации форме. Например, можно подсчитать суммарную площадь пиков, отвечающих соединениям с одинаковым числом углеродных атомов, и построить кривую распределения углеводов в данной фракции или определить примерное содержание в ней неразветвленных парафинов (эта величина, естественно, будет приближенной, поскольку независимо от характеристик колонки нельзя гарантировать, что пики неразветвленных парафинов не перекрываются с пиками каких-либо других соединений). Полученные результаты можно также представить в виде кривой перегонки, о чем более подробно говорится в разд. 16.8.

16.7. Многоядерные ароматические углеводороды

В последние 10 лет значительные усилия химиков-аналитиков были направлены на разработку методов обнаружения и количественного определения многоядерных ароматических углеводородов, что обусловлено потенциальной канцерогенностью некоторых представителей этой группы соединений. При чтении литературы, посвященной этим соединениям, следует проявлять особое внимание, поскольку для их обозначения используется различная номенклатура, а исторически сложившиеся названия усердно искореняются. Общеизвестные названия соединений обычно построены в соответствии с правилами Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC) [42], однако существуют и исключения. В качестве примера соединения, сохранившего вопреки тенденции к систематизации свое исторически сложившееся название, можно привести бензо[а]пирен, который, согласно правилам IUPAC, следовало бы называть бензо[def]хризенон.

Собственно газохроматографическому анализу смеси многоядерных ароматических углеводородов предшествуют стадии концентрирования и предварительного фракционирования, сложность которых в какой-то степени зависит от природы исходного образца. Список объектов, исследованных с целью обнаружения и количественного определения этих соединений, весьма обширен. В частности, он включает выхлопные газы автомобилей [43, 44], смазочные масла [45—47], бензин [44, 46], табачный дым [48, 49], отдельные вещества [50, 51], морские моллюски и отложения [52, 53], пищевое сырье [54] и промышленные сточные воды [55]. Цитируемые здесь работы приводятся лишь в качестве типичных примеров, ими отнюдь не исчерпывается обширная литература, посвященная этой теме.

Несмотря на большое разнообразие исходных материалов, описываемые во многих статьях методики предварительной очистки довольно похожи друг на друга. После экстракции подходящим растворителем ароматические соединения отделяют от других углеводородов с помощью жидкостной хроматографии на силикагеле, а далее для выделения фракции многоядерных ароматических соединений используют гель-хроматографию. Типичная схема такого рода предварительной очистки приведена на рис. 16.9 [45]. Иногда с тем, чтобы упростить экстракцию, ее проводят более селективными растворителями, например нитрометаном, ацетонитрилом и диметилсульфоксидом. Естественно, в ходе предварительной очистки и концентрирования неизбежны потери, поэтому, чтобы оценить выход целевых продуктов, к исходному образцу обычно добавляют меченное радиоактивным изотопом многоядерное ароматическое соединение, например ^{14}C бензо[а]пирен [49]. Кроме того, перед газохроматографическим анализом в смесь вводят некое химическое неактивное соединение, в частности пицен, которое служит внутренним стандартом.

Авторы работы [56] провели разделение многоядерных ароматических углеводородов на изготовленной из нержавеющей стали колонке размером $3 \text{ м} \times 2,2 \text{ мм}$ (внутр. диам.), содержащей 2% (по массе) силиконовой фазы SE-30 на хромосорбе G (размер частиц 80—100 меш). Вероятно, потому что разрешающая способность этой колонки сравнительно мала, элюат разделяли на два потока, один из которых направляли в пламенно-ионизационный детектор, а второй собирали в специальные ловушки в виде отдельных фракций, а затем с помощью УФ-спектроскопии проводили качественный и количественный анализ этих фракций. Авторы работы [50] проводили разделение на колонке размером $1 \text{ м} \times 4 \text{ мм}$ (внутр. диам.), заполнен-

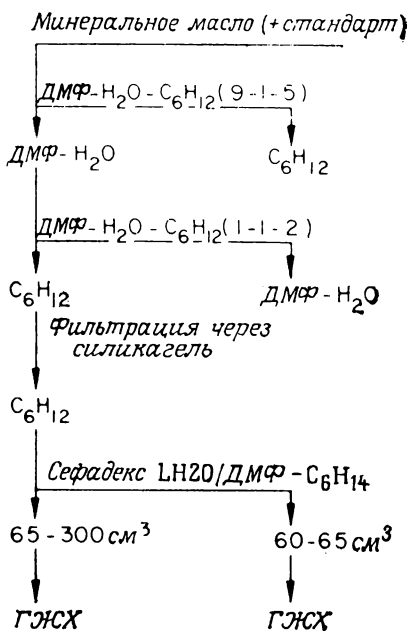


Рис. 16.9. Схема выделения многоядерных ароматических углеводородов из минерального масла [45] (с разрешения авторов).

ной сорбентом дексил-300, также собирали отдельные фракции, которые затем анализировали с помощью метода флуоресценции. В работе [45] сообщается о широком использовании высокоэффективных стеклянных колонок размером 10 м×2 мм (внутр. диам.), содержащих 5% (по массе) OV-101 на газохроме Q. Однако с начала 1970-х годов наметилась [44] и в последующие годы постоянно усиливалась тенденция к применению стеклянных капиллярных колонок, покрытых разнообразными силиконами. В ряде работ [48, 57—60] рассматривается разделение смесей многоядерных ароматических углеводородов на жидкокристаллических соединениях, выполняющих роль неподвижных фаз. Хотя на этих фазах и удалось разделить ряд таких соединений, для которых характерно невысокое разрешение на силиконовых фазах, тем не менее в целом указанные фазы не имеют каких-либо ярко выраженных преимуществ; нельзя также сказать, что картины разделения на таких фазах выгодно отличаются от полученных на покрытых силиконом колонках высокого разрешения.

16.8. Смазочные масла и сырая нефть

Смазочные масла представляют собой сложные смеси парафинов, наftenов и ароматических углеводородов с высокими температурами кипения (примерно от 350 до 550 °C), т. е. молекулярная масса компонентов этих смесей лежит в пределах от 300 до 600. Сама по себе газовая хроматография не позволяет разделять такого рода смеси на индивидуальные компоненты, однако с ее помощью можно построить кривую, моделирующую кривую перегонки, и таким образом получить весьма полезную информацию. Если смазочное масло хроматографировать на короткой насадочной колонке, содержащей неполярную силиконовую неподвижную фазу, то в режиме линейного температурного градиента компоненты масла элюируются в порядке увеличения их температуры кипения; хроматограмма такого типа представлена на рис. 16.10. Откалибровав газовый хроматограф по смеси соединений с известными температурами кипения (обычно смеси *n*-парафинов), можно на полученной хроматограмме заменить ось времени на шкалу температур. В процессе хроматографирования с помощью интегратора или компьютерной системы через определенные промежутки времени (обычно через каждые 10 с) измеряют площадь соответствующего фрагмента хроматограммы, после чего строят кривую зависимости величины этих площадей от температуры кипения и таким образом получают смоделированную кривую перегонки. Если образец имеет очень высокую температуру кипения, к нему необходимо добавить некоторое количество низкокипя-

щего внутреннего стандарта типа н-додекана, поскольку количественный выход всего образца маловероятен. Более детальную информацию о построении кривой перегонки можно почерпнуть в описании метода (D 2887), предложенного Американским обществом по испытанию материалов. Аналогичным образом можно построить кривую перегонки низкокипящих смесей, например бензинов (см. метод D 3710).

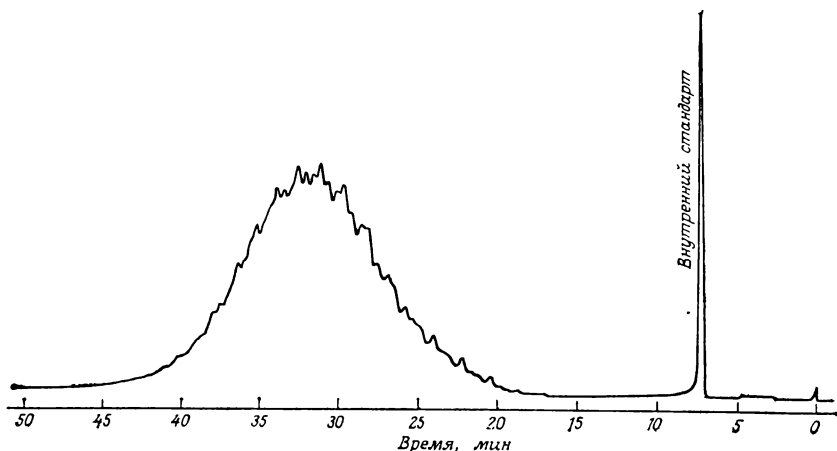


Рис. 16.10. Хроматограмма смазочного масла.

Колонка: 1 м×3,2 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза: 5% OV-101 на хромсорбсе W (размер частиц 60—80 меш); температура: подъем температуры от 60 до 320 °C со скоростью 5 °C/мин; газ-носитель: гелий; скорость потока: 25 мл/мин; объем образца: 1 мкл.

Сырая нефть, как и смазочные масла, представляет собой сложную смесь парафинов, нафтенов и ароматических углеводородов, однако интервал молекулярных масс составляющих ее компонентов значительно шире: от 16 (метан) до 800 и выше (асфальтены). В разд. 16.4 говорилось о разделении извлекаемых из нефти смесей углеводородов с низкой молекулярной массой (вплоть до C₈), а разделение высокомолекулярных компонентов, газохроматографический анализ которых невозможен, можно осуществить при помощи методов жидкостной хроматографии [61]. Обычный газохроматографический анализ применим только для углеводородов, содержащих до 42 углеродных атомов, однако их выход составляет лишь 80—90%. Поскольку добиться количественного выхода, как правило, невозможно, в пробу, как и при анализе смазочных масел, необходимо вводить внутренний стандарт. Практическое применение такой методики анализа сопряжено со значительными трудностями, которые обусловлены тем, что на хроматограмме сырой нефти отсутствуют достаточно протяженные провалы, и подобрать такой

внутренний стандарт, пик которого не перекрывался хотя бы с одним из пиков, отвечающих компонентам анализируемой смеси, не представляется возможным. Поэтому в качестве внутреннего стандарта выбирают некий нормальный алкан и хроматографируют образцы дважды — один раз в отсутствие стандарта, а второй раз в его присутствии. Для внесения поправки на различие в объемах этих двух образцов можно использовать любой подходящий пик на полученных хроматограммах; исходя из скорректированных таким образом хроматограмм, вычисляют отношение сигнала детектора к массе добавленного стандарта и с учетом этого отношения устанавливают количества каждого из компонентов. Чтобы увеличить относительное содержание внутреннего стандарта и не перегрузить при этом пламенно-ионизационный детектор, Уорман и Грин [62] предложили вводить в образец не один, а четыре различных внутренних стандарта, т. е. четыре различных нормальных алкана. МакТаггарт и Глейшер [63] сравнили результаты, полученные с помощью этого метода и при перегонке того же самого образца на ректификационной колонке, высота которой эквивалентна 15 теоретическим тарелкам, и обнаружили, что эти результаты хорошо согласуются. В настоящее время метод, предусматривающий введение четырех внутренних стандартов, широко применяется во всех областях нефтяной промышленности.

16.9. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография используется для разделения смесей углеводородов уже в течение многих лет. Опубликованная в 1951 г. работа Кридла и Ле Турно была положена в основу одного из первых стандартных методов анализа смесей углеводородов с помощью жидкостной хроматографии [65]. Разделение смеси в соответствии с этим методом проводится так: на стеклянную колонку размером 122 см×1,6 мм (внутр. диам.), заполненную сухим силикагелем (размер частиц 100—200 меш), одновременно с образцом наносят три флуоресцентных красителя, которые перемещаются по колонке вместе с компонентами смеси и при УФ-облучении обнаруживаются в виде трех полос, расположенных на границах раздела зон предельных, непредельных и ароматических углеводородов и в конце последней зоны (отсюда и название метода — анализ с использованием флуоресцентных индикаторов). Образец элюируют пропанолом-2 до тех пор, пока фронт растворителя, являющийся одновременно и фронтом предельных углеводородов, не окажется на расстоянии нескольких сантиметров от нижнего конца колонки, измеряют длину каждой зоны и по отношению этих величин к их сумме определяют относительное содер-

жание предельных, непредельных и ароматических углеводородов в исходной смеси. Вытеснительная хроматография, а именно к этому типу хроматографии относится вышеописанный метод анализа, значительно менее распространена, чем проявительная, однако разделение смеси соединений на отдельные классы или группы, а не на индивидуальные компоненты является характерной особенностью многих методов жидкостной хроматографии. Именно этой особенностью жидкостной хроматографии и обусловлено ее использование для предварительного фракционирования сложных смесей (см., например, описанную в разд. 16.7 методику анализа смесей многоядерных ароматических углеводородов).

В качестве типичного примера применения принципа проявительной хроматографии можно привести предложенный Американским обществом по испытанию материалов метод (D 2549), предназначенный для разделения фракций ароматических и неароматических углеводородов высококипящей нефти. Образец хроматографируют на колонке, наполненной силикагелем (нижний слой) и оксидом алюминия (верхний слой). Насыщенные углеводороды элюируют *n*-пентаном, а ароматические — последовательно эфиром, хлороформом и этанолом.

Значительные успехи в жидкостной хроматографии были достигнуты в последние несколько лет, после того как выяснилось, что эффективность разделения можно существенно повысить, если проводить разделение на адсорбентах с частицами размером 5—10 мкм. Колонки, заполненные такими мелкими частицами, отличаются высоким сопротивлением потоку жидкости, и, следовательно, чтобы пропустить через них элюент, его необходимо подавать под большим давлением (порядка 3,447—34,47 МПа). Однако осуществить это не столь уже сложно, поскольку насосы, способные развивать такие давления, легкодоступны. Существенно большее значение имеет тот факт, что у колонок, предназначенных для ВЭЖХ, низкая емкость по веществу (от нескольких миллиграммов и ниже), поэтому их применение в методах типа D 2549 невозможно. Поскольку процедура сбора фракций и определения их состава весьма трудоемка и отнимает много времени, при помощи детектора проводится непрерывное обнаружение соединений в элюате. Как и для газовой хроматографии, для жидкостной хроматографии предложено много различных типов детекторов, однако, как впоследствии выяснилось, три типа детекторов — УФ-детекторы с фиксированной и переменной длиной волны, флуориметрические и проточные рефрактометры — значительно превосходят все остальные, и именно они получили наиболее широкое распространение. Рефрактометр является универсальным детектором и как таковой пригоден для обнаружения углеводородов,

Однако чувствительность его ниже, чем у УФ-детектора. Чтобы повысить чувствительность рефрактометра, авторы работы [66] использовали в качестве элюента флуоринерт FC-78 (фирменное название фторированного углеводорода). В силу того что этот растворитель имеет очень низкое значение коэффициента преломления (1,25), в его присутствии можно обнаруживать даже низшие предельные углеводороды. Именно это обстоятельство и положено в основу описанного в работе [66] метода разделения углеводородов с помощью ВЭЖХ, который равноценен методу анализа с флуоресцентными индикаторами (см. выше). При разделении смесей углеводородов, кипящих при температурах 190—360 °С, элюентом может служить *n*-гексан, поскольку низшие и высшие углеводороды существенно различаются по величине коэффициента преломления [67].

Описанный в этой работе метод в какой-то степени аналогичен газохроматографическому анализу таких смесей: после выхода из колонки предельных углеводородов и олефинов направление потока растворителя меняют и таким образом элюируют ароматические соединения. Этот прием позволяет сократить длительность анализа и способствует сужению пиков, отвечающих ароматическим углеводородам. Данный метод включен в программу исследований, проводимых рабочей группой Американского общества по испытанию материалов.

Помимо работы [66] известна лишь одна публикация, посвященная разделению углеводородов с использованием рефрактометра [68]. Впрочем, Колин и др. [69] сравнительно недавно опубликовали описание нового рефрактометрического детектора с лучшими по сравнению с предыдущими моделями характеристиками, что, возможно, будет способствовать развитию этой области.

Если разделение смесей всех типов углеводородов с помощью ВЭЖХ рассматривается лишь в считанных работах, то литература, посвященная ВЭЖХ смесей многоядерных ароматических углеводородов с применением флуориметрических и УФ-детекторов, весьма обширна. Опубликованный в 1977 г. обзор литературы по этому вопросу насчитывает 43 ссылки [70]; несколько более поздних работ [71—81] включено в список литературы к данной главе. В тех случаях, когда речь идет о процедуре разделения, мнения исследователей, по-видимому, разделяются: одни предпочитают колонки с такими адсорбентами, как силикагель или оксид алюминия, другие — колонки с неполярными сорбентами с химически связанным мелкодисперсным носителем и элюирование полярным растворителем (обращенно-фазовая хроматография), наконец, третьи отдают предпочтение методу жидко-жидкофазной распределительной хроматографии (в этом случае сорбентом служит полярная

жидкость, адсорбированная на поверхности микрочастиц носителя).

Типичным примером анализа при помощи адсорбционной хроматографии является разделение компонентов каменноугольной смолы на колонке 25 см×6 мм (внешн. диам.) с сорбентом партисил 5 (силикагель с размером частиц 5 мкм) [77]. На рис. 16.11 представлена хроматограмма, полученная при

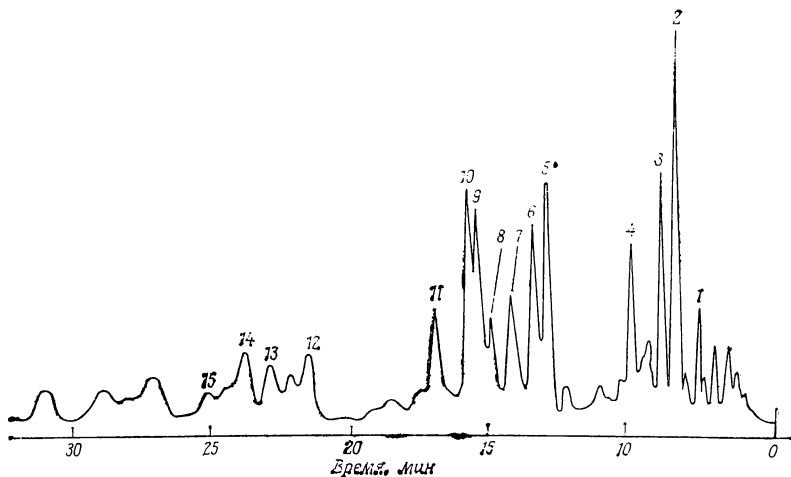


Рис. 16.11. ВЭЖХ растворимых в циклогексане компонентов каменноугольной смолы (условия разделения см. в тексте) [77] (с разрешения авторов).

1 — антрацен, 2 — пирен, 3 — 1-метилпирен, 4 — флуорантен, 5 — бенз[а]антрацен+хризен, 6 — бензо[а]пирен, 7 — бензо[е]пирен+антатрен, 8 — бензо[г, h, i]перилен, 9 — бензо[к]флуорантен, 10 — бензо[б]флуорантен, 11 — индено[1, 2, 3-с, d]пирен+коронен, 12 — дибенз[а, i]антрацен, 13 — дибенз[а, h]антрацен+дибенз[а, c]антрацен, 14 — дибензо[а, i]пирен+дибензо[а, h]пирен, 15 — дибензо[а, e]пирен.

элюировании колонки *n*-гексаном (скорость потока 2 мл/мин).

Один из примеров разделения при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ описан в работе [82]. Разделение проводилось на колонке размером 25 см×6 мм (внешн. диам.), заполненной мелкодисперсным силикагелем, обработанным октадецилхлорсиланом. Элюентом служил водный метанол, а в качестве системы обнаружения использовали последовательно соединенные УФ-детектор и проточный флуориметр с переменной длиной волны возбуждающего света, что обеспечивало высокую степень селективности обнаружения.

В работе [78] описано разделение на колонке размером 30 см×6 мм (внешн. диам.) с мелкодисперсным силикагелем, через который пропускали раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в гептане. Элюентом служил гептан, содержащий 0,35% ДМСО. Как и в вышеописанной методике, соединения

обнаруживали одновременно и по их поглощению, и по флуоресценции.

Авторы всех трех цитированных выше работ получили вполне хорошие хроматограммы, поэтому, основываясь на результатах этих трех работ, трудно прийти к заключению, какая из методик является наилучшей (впрочем, не исключено, что определение «наилучшая» в данном случае вообще неуместно). Приготовить высокоэффективную колонку для жидко-жидко-фазной хроматографии и в процессе эксплуатации поддерживать ее в таком состоянии, чтобы неподвижная фаза не вымывалась, довольно сложно. В настоящее время очень широкое распространение получила обращенно-фазовая ВЭЖХ. Отчасти это обусловлено тем, что в данном случае, меняя состав элюента (обычно путем изменения содержания воды), можно добиться кардинального изменения картины элюирования. Выбор подходящей системы жидкостной хроматографии в определенной мере зависит от природы анализируемого образца и от степени его предварительной очистки, однако помимо этого он, по-видимому, определяется и причинами более частного характера: некоторые исследователи предпочитают лишь определенные, хорошо им знакомые методики. Кроме того, при выборе системы следует учитывать и практические соображения: если данная лаборатория выполняет ряд различного типа анализов с использованием какой-то стандартной методики жидкостной хроматографии, то вполне естественно применить именно эту методику для анализа смесей многоядерных ароматических углеводов.

Описанные выше примеры успешного разделения смесей многоядерных ароматических углеводов при помощи жидкостной хроматографии позволяют предположить, что столь же успешно можно разделить и смеси других углеводов — достаточно лишь иметь в распоряжении подходящую систему обнаружения. В настоящее время наиболее многообещающими в этом отношении методами идентификации соединений являются ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием [83, 84] и масс-спектрометрия [85, 86], однако практическое применение соответствующих приборов в качестве детекторов представляет собой весьма серьезную проблему, которая пока еще не решена окончательно. Кроме того, применение таких детекторов накладывает довольно жесткие ограничения и на саму хроматографическую систему. Немаловажным фактором представляется также чрезвычайно высокая стоимость оборудования: приборы обоих типов более чем на порядок дороже жидкостного хроматографа. В силу последнего обстоятельства даже после решения всех практических проблем эти методики анализа вряд ли станут общедоступными.

В заключение следует упомянуть сверхкритическую флюидную хроматографию (СФХ). Этот метод предшествовал ВЭЖХ [87—89] и в определенном отношении даже проложил дорогу последней, поскольку практические трудности, с которыми пришлось столкнуться на стадии разработки СФХ, во многих отношениях аналогичны встретившимся на пути развития ВЭЖХ. СФХ отличается от других типов жидкостной хроматографии тем, что подвижной фазой в данном методе служит жидкость,

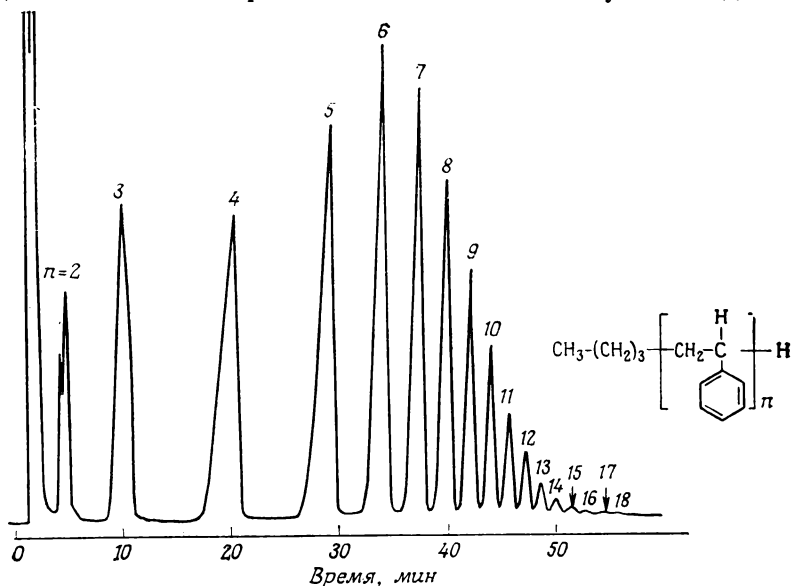


Рис. 16.12. Сверхкритическая флюидная хроматография олигомеров полистирола [90] (с разрешения авторов).

Колонка: 4 м × 3,2 мм (внешн. диам.); сорбент: порасил C(ODCS), размер частиц 120—150 меш; элюент: 5%-ный раствор метанола в пентане; скорость потока: 3,0—4,6 мл/мин; температура: 205 °С; давление: 4,14 МПа в течение 8 мин и последующее увеличение давления до 6,2 МПа со скоростью 41,4 кПа/мин; объем образца: 40 мкл 50%-ного раствора в бензоле.

нагретая до температуры выше критической (для *n*-пентана критическая температура составляет 196,9 °С), а критическое давление пентана равно 33,7 атм. Таким образом, вдобавок к проблемам, связанным с использованием высокого давления (в настоящее время уже решенным), возникает еще и проблема обеспечения безопасности работы с легковоспламеняющимися растворителями при высоких температурах. Из-за этих трудностей в качестве сверхкритической жидкости многие исследователи выбирали диоксид углерода. Это соединение явно более безопасно, его критическая температура (31,3 °С) лишь немного выше комнатной, а критическое давление равно 73,8

атм. В сверхкритическом состоянии соединения, подобные *n*-пентану и диоксиду углерода, действуют как чрезвычайно мощные растворители, и, несмотря на практические трудности, даже самые первые исследователи, применившие метод СФХ для разделения смесей высокомолекулярных соединений, получили прекрасные результаты, достоверность которых подтвердили более поздние работы [90, 91].

На рис. 16.12 приведена хроматограмма полистирола с номинальной молекулярной массой 600, на которой четко видны пики, отвечающие полимерам с молекулярной массой вплоть до 1900; эта хроматограмма была опубликована в 1969 г., однако полученная картина разделения превосходна даже по современным меркам [82]. В последние годы СФХ рассматривается лишь в очень немногих работах*. История науки полна примеров открытий и изобретений, сделанных в «подходящее» время и, наоборот, опередивших свое время. Метод СФХ появился в то время, когда сама мысль об эксплуатации колонок при давлениях порядка 7 МПа приводила исследователей в трепет. Теперь, когда в результате десятилетнего опыта использования ВЭЖХ эти условия стали привычными для хроматографистов и когда решены многие практические проблемы, по-видимому, настало время заняться совершенствованием методов СФХ.

16.10. Тонкослойная хроматография

Период возрождения ТСХ наступил в последние несколько лет в связи с разработкой метода высокоскоростной ТСХ. Этим термином называют хроматографию на пластинках с тонким слоем мелкодисперсных сорбентов, получивших широкое распространение в ВЭЖХ. К достоинствам ТСХ относятся высокая скорость разделения, простота аппаратного оформления и низкая стоимость, однако этот метод не может конкурировать с газовой хроматографией или ВЭЖХ в плане решающей способности и точности количественного определения. Вместе с тем он имеет и немаловажные преимущества: пластинки можно опрыскивать разнообразными реагентами, что обеспечивает достаточно высокую степень селективности обнаружения соединений, не столь легко достижимую при применении колоночной хроматографии. Например, углеводороды можно обнаруживать, опрыскивая пластинки концентрированной серной кислотой, которая обугливает органические соединения. ТСХ часто используют как метод предварительной очи-

* Использование хроматографии с подвижной фазой в сверхкритическом состоянии начинает расширяться. Фирма «Хьюлетт-Паккард» наладила выпуск хроматографов этого типа. — *Прим. ред.*

стки углеводородов перед их анализом с помощью газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также для фракционирования соединений с целью их последующего спектрального анализа [55, 93, 94]. Зоны многоядерных ароматических углеводородов обнаруживают на хроматограммах визуально при УФ-освещении пластинок.

Возрождению интереса к ТСХ способствовало также появление в продаже разработанного фирмой Iatron Laboratories

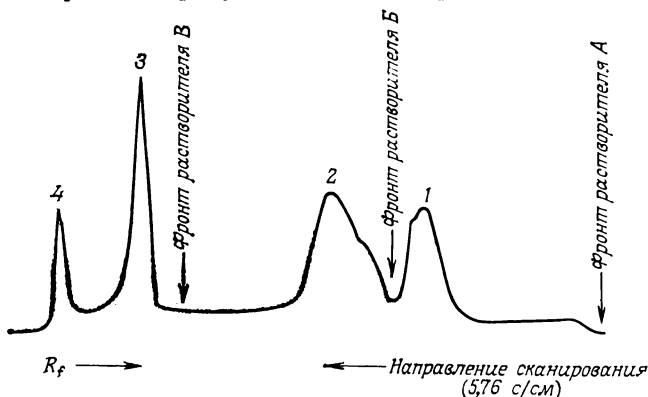


Рис. 16.13. Хроматограмма типичного топливного масла, полученная с помощью прибора Iatroscan Analyzer.

Системы растворителей: А — легкий петролейный эфир, В — толуол — легкий петролейный эфир (4 : 1), В — дихлорметан — метанол (19 : 1); пики: 1 — насыщенные углеводороды, 2 — ароматические углеводороды, 3 — полярные соединения, 4 — высокополярные соединения.

(Япония) анализатора «Iatroscan Analyzer» [95, 96]. В этом приборе используются кварцевые стержни диаметром 0,9 мм и длиной 153 мм, покрытые слоем силикагеля толщиной 75 мкм. Анализируемую смесь наносят на слой сорбента и элюируют подходящей системой растворителей, как в обычной ТСХ. По окончании хроматографирования дают растворителю полностью испариться, после чего стержень медленно, со строго постоянной скоростью пропускают через пламя пламенно-ионизационного детектора специальной конструкции, где продукты сгорания каждой зоны дают сигнал, который либо регистрируется с помощью самописца, либо передается в интегратор для количественной обработки. Непосредственно перед употреблением стержень пропускают через пламя детектора с тем, чтобы выжечь присутствующие в сорбенте органические вещества. Согласно утверждению фирмы, каждый стержень можно использовать около 100 раз, однако, если анализируют смеси высококипящих соединений, это число следует, вероятно, уменьшить вдвое. На рис. 16.13 представлена хромато-

грамма тяжелого топливного масла, полученная с помощью этого прибора. Проба масла путем последовательного элюирования растворителями с возрастающей полярностью была разделена на фракции насыщенных и ароматических углеводородов, полярных и очень полярных соединений. Даже в таком случае, когда разделение компонентов смеси происходит в соответствии с их принадлежностью к определенному типу соединений, можно построить корреляционные зависимости между составом и рабочими характеристиками топлива, а также получить информацию, полезную для корректировки процесса его очистки [97]. Как и при использовании пламенно-ионизационного детектора в газовой хроматографии, чтобы получить наиболее точные количественные данные, детектор необходимо откалибровать по набору таких стандартных смесей, в состав которых входили бы все компоненты анализируемого образца.

16.11. Заключение

Обсуждать будущее того или иного метода всегда рискованно, поскольку на фоне постепенного развития может внезапно произойти резкий качественный скачок. Примером такого скачка может служить введение в хроматографическую практику капиллярных колонок [98].

Последние достижения в области газовой хроматографии, связанные с применением кварцевых колонок [99], приведут, по-видимому, к более глубокому пониманию физико-химических свойств неподвижной жидкой фазы, что в свою очередь позволит создать более эффективные колонки. Уже к настоящему времени эффективность колонок увеличилась от 2000—3000 до 4000—5000 тарелок на метр длины колонки, и в ближайшие несколько лет эффективность колонок будет неуклонно возрастать. С появлением кварцевых трубок внутренним диаметром 0,025—0,05 мм будет совершенствоваться подход, предложенный Дести и др. [100], которые еще в начале 60-х годов описали метод очень быстрого газохроматографического разделения. В то же время появление в продаже кварцевых трубок с внутренним диаметром 0,7 мм, возможно, приведет к постепенной замене насадочных колонок на капиллярные, поскольку уже показано, что стальные колонки таких размеров по своей емкости и характеристикам потока газа-носителя не уступают насадочным колонкам, а по разрешающей способности значительно их превосходят [101]. Более широкое применение получат такие методические приемы, как переключение колонок, получение («вырезание») целевой фракции на первой колонке и проведение ее подробного анализа на второй («основной») колонке и изменение направления потока [102].

Совершенно необходимо заменить способ введения образца с помощью шприца на какой-либо другой, и можно лишь выразить сожаление по поводу того, что хроматографическая система, снабженная соответствующим инжектором [103], снята с производства. В качестве приспособлений, обеспечивающих автоматический (в соответствии с заданной программой) отбор проб и непрерывность анализа углеводов в масштабе завода, могут найти применение специальные логические коммутационные устройства [104].

Если бы можно было существенно увеличить чувствительность пламенно-ионизационного детектора, появилась бы возможность на колонках с очень низким содержанием неподвижной фазы и при сравнительно низких температурах добиться разделения углеводов с более высокой молекулярной массой, которые в настоящее время не являются объектами газохроматографического анализа. Селективные детекторы всегда потенциально полезны, и на основании накопленного опыта работы можно предположить, что пламенно-эмиссионные детекторы найдут более широкое применение [105—108]. Число хроматографистов, использующих в качестве газохроматографического детектора простые квадрупольные масс-спектрометры, чрезвычайно возросло, если бы появилась возможность существенно снизить стоимость этих приборов.

Развитие жидкостной хроматографии, как и развитие газовой хроматографии, почти наверняка будет сопровождаться постепенным увеличением эффективности колонок и уменьшением их диаметра, хотя достоинства микроколонок в настоящее время являются предметом дискуссии. Как отмечено в разд. 16.9, ВЭЖХ остро нуждается в детекторе, обладающем высокой чувствительностью по отношению к углеводородам. В связи с этим изучается возможность использования видеоконных трубок (videcon tube) вместо очень дорогих ИК-спектрометров с фурье-преобразованием [109, 110]. Хотя пока очень хорошего разрешения достигнуть не удалось, тем не менее потенциальные возможности дальнейшего усовершенствования такого метода далеко не исчерпаны. Основной помехой в этом направлении является сравнительно небольшой рынок сбыта жидкостных хроматографов; это означает, что создания новых систем можно ожидать только лишь в связи с достижениями более общего характера в области электроники.

Совершенно незатронутыми остались вопросы, связанные с препаративной хроматографией; эта тема столь обширна, что вполне заслуживает, чтобы ей была посвящена отдельная глава. Вообще говоря, все хроматографические методы являются методами «бесконечного разбавления», поэтому, чем меньше количество образца, тем лучше разделение. Однако в некоторых

случаях желательно использовать образцы большого объема или большей массы, с тем чтобы получить фракции для последующего анализа. Например, жидкостная хроматография часто служит методом предварительного разделения смесей на фракции алифатических и ароматических углеводородов, которые далее анализируют с помощью газовой хроматографии. Оба метода позволяют хроматографировать вплоть до 100 мг вещества; для этого необходимо либо увеличить размеры колонок, чтобы работать в режиме автоматического многократного введения определенных аликвот образца в колонку, размеры которой лишь немного больше размеров обычной аналитической колонки. Если же предполагается с помощью препаративной хроматографии получать килограммы или даже тонны вещества, то такого рода разделение — по крайней мере применительно к смесям углеводородов — малоперспективно, поскольку трудно представить себе, чем можно было бы оправдать необходимые материальные затраты.

Литература

1. Huyten F. H., Rijnders G. W. A., van Beersum W. — In: *Gas Chromatography 1962*,/Ed. van Swaay M. London: Butterworths, 1962, p. 335.
2. Hollis O. L. *Anal. Chem.*, **38**, 309 (1966).
3. Stufkens J. S., Bogaard H. J. *Anal. Chem.*, **47**, 383 (1975).
4. Picker J. E., Sievers R. E. *J. Chromatogr.*, **203**, 29 (1981).
5. Desty D. H. *Chromatographia*, **8**, 452 (1975).
6. Grob K., Grob G. J. *Chromatogr.*, **90**, 303 (1974).
7. Grob K., Grob K., Jr., Grob G. J. *Chromatogr.*, **106**, 299 (1975).
8. Grob K., Grob G., J. *Chromatogr.*, **125**, 471 (1976).
9. Grob K., Grob G., Grob K., Jr. *Chromatographia*, **10**, 181 (1977).
10. Grob J., Guenter J. R., Portmann A. J. *Chromatogr.*, **147**, 111 (1978).
11. Grob K., Grob K., Jr. *J. Chromatogr.*, **151**, 311 (1978).
12. Adlard E. R., *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **5**, 13 (1975).
13. Law R. J. *Marine Poll. Bull.*, **9**, 321 (1978).
14. Clarke A., Law R. J. *Marine Poll. Bull.*, **12**, 10 (1981).
15. Al-Thamir W. K., Laub R. J., Purnell J. H. J. *Chromatogr.*, **142**, 3 (1977).
16. Al-Thamir W. K., Laub R. J., Purnell J. H. J. *Chromatogr.*, **188**, 79 (1980).
17. Eggertsen F. T., Knight H. S., Groennings S. *Anal. Chem.*, **28**, 303 (1956).
18. McKenna T., Idleman J. *Anal. Chem.*, **32**, 1299 (1960).
19. McTaggart N. G., Miller C. A., Pearce B. J. *Inst. Petrol.*, **54**, 265 (1968).
20. Fredericks E. M., Brooks F. R. *Anal. Chem.*, **28**, 297 (1956).
21. Sanders W. N., Maynard J. B. *Anal. Chem.*, **40**, 527 (1968).
22. Whittemore I. M. — In: *Chromatography in Petroleum Analysis*,/Eds. Algel K. H., Gouw T. H. New York: Dekker, 1979, p. 41.
23. Adlard E. R., Bowen A. W., Salmon D. G. J. *Chromatogr.*, **186**, 207 (1979).
24. Schulz H., Gregor B., Lochmiller R., San Min S. 26th DGMK Meeting, Berlin, 4—6 Oct. 1978, *Compend. Deut. Gas Mineralölwiss. Kohlechem*, **78/79**, 1407 (1978).
25. Riedo F., Fritz D., Tarján G., sz. Kováts E. J. *Chromatogr.*, **126**, 63 (1976).
26. Vernon F., Ogundipe C. O. E. *J. Chromatogr.*, **132**, 181 (1977).
27. Haken J. K., Vernon F. J. *Chromatogr.*, **186**, 89 (1979).
28. Onuska F. I. *J. Chromatogr.*, **186**, 259 (1979).
29. Martin R. L. *Anal. Chem.*, **34**, 896 (1962).

30. Robinson R. E., Coe R. H., O'Neal J. M. *Anal. Chem.*, **43**, 591 (1971).
31. Stavinsola L. L. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 72 (1975).
32. Bradford B. W., Harvey D., Chalkley D. E. *J. Inst. Petrol.*, **41**, 80 (1955).
33. Wasik S. P., Tsang W. J. *Phys. Chem.*, **74**, 2970 (1970).
34. Cvetavonic R. J., Duncan F. J., Falconer W. E., Irwin R. S. *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 1827 (1965).
35. Gil-Av E., Schurig V. *Anal. Chem.*, **43**, 2030 (1971).
36. Schurig V., Chang R. C., Zlatkis A., Gil-Av E., Mikes F. *Chromatographia*, **6**, 223 (1973).
37. Guha O. K., Janák J. *J. Chromatogr.*, **68**, 325 (1972).
38. Soják L., Hrivňák J., Ostrovský I., Janák J. *J. Chromatogr.*, **91**, 613 (1974).
39. Soják L., Krupčík J., Janák J. *J. Chromatogr.*, **195**, 43 (1980).
40. Schurig V. *Chromatographia*, **13**, 263 (1980).
41. Adlard E. R. — In: *Chromatography of Petroleum Analysis*./Eds. Altgelt K. H., Gouw T. H. New York: Dekker, p. 137.
42. Bultin A. G. Personal communication.
43. Grimmer G., Hildebrandt A., Böhnke H. *Erdöl Kohle*, **25**, 531 (1972).
44. Doran T., McTaggart N. G. *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 715 (1974).
45. Grimmer G., Böhnke H. *Chromatographia*, **9**, 30 (1976).
46. Kaschani D. T. *Fachgruppentagung Hannover, GFR*, 6—8 Oct. 1975, *Compend. Deut. Gas Mineralölwiss. Kohlechem.*, **75/76**, 606 (1975).
47. Lee M. L., Bartle K. D., Novotný M. V. *Anal. Chem.*, **47**, 540 (1975).
48. Janini G. M., Shaikh B., Zielinski W. L., Jr. *J. Chromatogr.*, **132**, 136 (1977).
49. Severson R. F., Snook M. E., Arrendale R. F., Chortýk O. T. **48**, 1866 (1976).
50. John E. D., Nickless G. J. *Chromatogr.*, **138**, 399 (1977).
51. Bjøseth A. *Anal. Chim. Acta*, **94**, 21 (1977).
52. Dunn B. P., *Environ. Sci. Technol.*, **10**, 1018 (1976).
53. Cretney W. J., Christensen P. A., McIntyre B. W., Fowler B. R. — In: *Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in the Marine Environment*./Eds. Afghan B. K., Mackay D. New York: Plenum, 1980, p. 315.
54. Grimmer G., Böhnke H. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **58**, 725 (1975).
55. Kadar R., Nagy K., Fremstad D. *Talanta*, **27**, 227 (1980).
56. Brown R. A., Searl T. D. — In: *Chromatography of Petroleum Analysis*./Eds. Altgelt K. H., Gouw T. H. New York: Dekker, 1979, p. 367.
57. Janini G. M., Johnston K., Zielinski W. L., Jr. *Anal. Chem.*, **47**, 670 (1975).
58. Janini G. M., Muschik G. M., Zielinski W. L., Jr. *Anal. Chem.*, **48**, 809 (1976).
59. Janini G. M., Muschik G. M., Schroer J. A., Zielinski W. L., Jr. *Anal. Chem.*, **48**, 1879 (1976).
60. Zielinski W. L., Jr. *Ind. Res. Dev.*, **19**, 178 (1980).
61. Hajibrahim S. K., Tibberts P. J. C., Watts C. D., Maxwell J. R., Eglington G., Colin H., Guiochon G. *Anal. Chem.*, **50**, 549 (1978).
62. Worman J. C., Green L. E. *Anal. Chem.*, **37**, 1620 (1965).
63. McTaggart N. G., Glaysher P. — In: *Recent Analytical Developments in the Petroleum Industry*./Ed. Hodges D. R. Barking: Applied Science Publishers, 1974, p. 79.
64. Criddle D. W., le Tourneau R. L. *Anal. Chem.*, **23**, 1620 (1951).
65. ASTM Method D1319. PA. Philadelphia: Amer. Soc. Testing Mat., and IP Method 156; London: Inst. Petroleum.
66. Suatoni J. C., Garber H. R., Davis B. R. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 367 (1975).
67. Suatoni J. C., Garber H. R. *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 546 (1976).
68. Robinson S. C. F. *Chromatographia*, **12**, 439 (1979).
69. Colin H., Jaulmes A., Guiochon J., Simon J. *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 485 (1979).

70. Thomas R., Zander M. *Erdöl Kohle*, **30**, 403 (1977).
71. Kasiske D., Klinkmüller K. D., Sonneborn M. J. *Chromatogr.*, **149**, 703 (1978).
72. Goldstein G. J. *Chromatogr.*, **129**, 61 (1976).
73. Radecki A., Lamparczyk H., Grzybowski J., Halkiewicz J. J. *Chromatogr.*, **150**, 527 (1978).
74. Das B. S., Thomas G. H. *Anal. Chem.*, **50**, 967 (1978).
75. Matsunaga A., Yagi M. *Anal. Chem.*, **50**, 753 (1978).
76. Thomas R. S., Lao R. C., Wang D. T., Robinson D., Sakuma T. — In: *Carcinogenesis*, Vol. 3. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons./Eds. Jones P. W., Freudenthal R. I. New York: Raven, 1978, p. 9.
77. Grant D. W., Meiris R. B. J. *Chromatogr.*, **142**, 339 (1977).
78. Durand J. P., Petroff N. J. *Chromatogr.*, **190**, 85 (1980).
79. U.S. Environ. Protect. Agency Fed. Reg., **44**, No. 233, 3 Dec. 1979, Method 610.
80. Boden H. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 391 (1976).
81. Colin J. M., Vion G. *Analysis*, **8**, 224 (1980).
82. Wheals B. B., Vaughan C. G., Whitehouse M. J. J. *Chromatogr.*, **106**, 109 (1975).
83. Kuehl D., Griffiths P. R. J. *Chromatogr. Sci.*, **17**, 471 (1979).
84. Vidrine D. W. J. *Chromatogr. Sci.*, **17**, 477 (1979).
85. Arpino P. J., Guiochon G. *Anal. Chem.*, **51**, 682A (1979).
86. McFadden W. H. J. *Chromatogr. Sci.*, **18**, 97 (1980).
87. Sie S. T., van Beersum W., Rijnders G. W. A. *Separ. Sci.*, **1**, 459 (1966).
88. Sie S. T., Rijnders G. W. A. *Separ. Sci.*, **2**, 729 (1967).
89. Sie S. T., Rijnders G. W. A. *Separ. Sci.*, **2**, 755 (1967).
90. Jentoft R. E., Gouw T. H. J. *Polym. Sci., Part B*, **7**, 811 (1969).
91. Jentoft R. E., Gouw T. H. *Anal. Chem.*, **48**, 2195 (1976).
92. Gouw T. H., Jentoft R. E. — In: *Chromatography in Petroleum Analysis*./Eds. Algelt K. H., Gouw T. H. New York: Dekker, 1979, p. 313.
93. Hurtubise R. J., Schabron J. F., Feaster J. D., Therklidsen D. H., Poulson R. E. *Anal. Chim. Acta*, **89**, 377 (1977).
94. Gilchrist C. A., Lynes A., Steel G., Witham B. T. *Analyst* (London), **97**, 880 (1972).
95. Okumura T., Kadono T. *Bunseki Kagaku*, **22**, 980 (1973).
96. Sipos J. C., Ackman R. G. J. *Chromatogr. Sci.*, **16**, 443 (1978).
97. Wernicke H. J., Lassmann E. 26th DGMK Meeting, Berlin, 4—6 Oct. 1978, Compend. Deut. Gas Mineralöw. Kohlechem.; **78/79**, 1484 (1978).
98. Golay M. J. E. — In: *Gas Chromatography*, Amsterdam, 1958./Ed. Desty D. H. London: Butterworths, 1958, p. 36.
99. Dandeneau R., Bente P., Rooney T., Hiskes R. *Amer. Lab.*, **11**, No. 9, 61 (1979).
100. Desty D. H., Goldup A., Swanton W. T. — In: 3rd ISA Symp. Gas Chromatogr. June 1961./Eds. Brenner N., Callen J. E., Weiss M. D. New York: Academic Press, 1962, p. 105.
101. Adlard E. R., Creaser L. F., Matthews P. H. D. *Anal. Chem.*, **44**, 62 (1972).
102. Deans D. R. *Chromatographia*, **1/2**, 18 (1968).
103. Otte E., Jentsch D. — In: *Gas Chromatography 1970*./Ed. Stock R. London: The Institute of Petroleum, 1971, p. 218.
104. Annino R., Gonnord M. F., Guiochon G. *Anal. Chem.*, **51**, 379 (1979).
105. Aue W. A., Hill H. H. J. *Chromatogr.*, **74**, 319 (1972).
106. Aue W. A., Hill H. H. J. *Chromatogr. Sci.*, **12**, 541 (1974).
107. Aue W. A., Hill H. H. J. *Chromatogr.*, **122**, 515 (1976).
108. Aue W. A., Flinn C. G. J. *Chromatogr.*, **186**, 299 (1979).
109. Dessy R. E., Nunn W. G., Titus C. A. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 195 (1976).
110. Ratzlaff K. L. *Anal. Chem.*, **52**, 916 (1980).

Предметный указатель

- Абат 293
Азалаеатин 250
Азинфосметил 286
Азодрин 293
Азот 345, 348—352, 357, 362
Азота
 оксиды 345, 349, 352, 353, 363
 трифторид 345
Активный 326
Актиномицины 338
Алкиластатиды 330
Алкилсвинец 357
Аллоза 57
Альдрин 284, 293
Алпренолол 104, 114
Алюминий 316
Альтроза 57
Аметрин 282
Амикацин 147
Амилопектины 75
Аминокарб 279
Аминонитразепам 109
Аминоптерин 117
Аминоциклиты 146
Амитриптилин 97, 98, 107, 124
Ампициллин 150
Амфетамины 127
Амфотерицины 152
Анорексигенные препараты 128
Антазолин 120
Антибиотики 146 и сл.
 аминогликозиды 146, 147
 макролиды 148, 149
 полиены 152, 153
 полипептиды 152
Антигистаминные препараты 119
Антидепрессанты трициклические 96, 97,
 106, 107, 123
Антиконвульсанты 91, 92, 105
Антиаритмические препараты 102 и сл.,
 113, 129
Антоцианы 253, 260, 264, 268, 270
Антрахиноны 263, 266, 271
Антрацен 401
Антроны 263
Апигенин 254
 6-гликозилпроизводные 262
Апрамицин 153
Арабиноза 44, 45
Арабит 49, 63
Аргон 345, 347, 349
Арохлор 1242 285
Арсин 345, 357
Аскозин 153
Аспирин 121
Атенолол 115
Атразин 281, 282, 301
Атратон 281, 282
Ауроны 246, 248, 256
Аффинная хроматография
 рибонуклеиновых кислот 176 и сл.
 углеводов 34 и сл.
Ацетаминофен 105, 124
Ацетанизидин 124
Ацетат-ионы 322
Ацебутолол 129, 130
Ацетилен 349
N-Ацетилнейраминная кислота 33, 57, 70,
 101
N-Ацетилпрокаиnamид 129
Бакс 279
Бактериохлорофилл а 201, 202, 230, 233
Барбитураты 93—96, 106, 126
Бацитрадин 152
Бензантрацен 401
Бензоат натрия 118
Бензодиазепины 98—101, 108 и сл., 124
Бензол 380, 385, 386
Бензоперилен 401
Бензопирен 401
Бензофлуорен 401
Бензохиноны 263, 271
Бентиокарб 279
Бериллий 330
Бетацаны 247, 252, 253
Биоавтография 145, 146, 149, 152
Биливердин 236
Билирубин 201, 236
Бифлавоны 244, 256, 262, 271
Блокаторы β -адренэргических рецепторов
 103, 104, 113—115, 129
Бора
 трифторид 345
 трихлорид 358
Бретилий 114
Бромазепам 109
Брома пентафторид 355
Бромат-ионы 327
Бромдифенгидрамин 119
Бромид-ионы 327
Буклизин 120
Бутабарбитон 106
Бутадиен 382, 383
Бутан 379—383
Бутен 382—385
Бутилат 279
Бутилбензол 385, 388
Бутирозины 148

- Ванадий 316
 Ванкомицин 154
 Ванилиновая кислота 245
 Вердамицин 148
 Вернолат 279
 Винилхлорид 356
 •Висмута бромид 357
 Вода 349—351, 359
 Водород 345, 349, 352, 357, 359
 Водорода
 бромид 345
 иодид 345
 селенид, 345, 357
 сульфид 345, 349, 353, 355
 фторид 345, 355
 хлорид 345, 356, 357
 цианид 345, 353
 •Вольфрама гексафторид 345
- Гадоллиний 326, 336, 337
 Галактит 9, 13, 17, 47, 61, 63
 Галактиманнаны 75
 Галактоза 8, 9, 13, 17, 23, 45—47, 57, 61, 63, 66, 68, 70, 100
 •Галактуроновая кислота 20, 24, 45, 57, 58, 63
 Галандин 270
 Галлиевая кислота 257
 Галлий 310, 316, 318, 319
 Ганглиозиды 11, 70
 •Газы
 биологического происхождения 352
 инертные 352
 неуглеводородные 344 и сл.
 количественный микроанализ 359, 363
 постоянные 349—351
 промышленные 351
 углеводородные см. также Углеводороды 345, 349 и сл., 378 и сл.
 Галовакс 1013 285
 •Галогенов газообразные соединения 354 и сл.
 Гексан 386
 Гексен 385, 386
 Гексахлорбензол 292, 293
 Гексахлорпентадиен 284
 •Гексахлорциклопентадиен 284
 Гелий 345, 352, 363
 Гематогемин 213
 Гематопорфирин 207, 209, 212, 213, 217, 219, 228
 Гем 201
 •Гемины 205, 212—215, 227—229
 Гентамицины 146
 Гентизиновая кислота 257
 Гепарин 26
 Гептан 387, 389
 Гептен 386, 387
 Гептахлор 293
 Гептахлорэпоксид 284, 285, 293
 Германий 330, 358
 Германия тетрагидрид 357
 Гидралазин 114
 Гидриды 357
 Гидрохинон 257
 Гликопротеины 33, 47, 51, 54, 57—59, 70, 76
 Глицерин 13, 16, 17, 47, 55
 Глутетимид 127
 Глюканы 75
 •Глюкоза 7 и сл., 23—25, 34, 44, 47, 49, 56—58, 61, 63, 66, 68, 101
 Глюкозаминогликаны 30—33, 54, 64, 75, 76
 Глюкуроновая кислота 20, 24, 45, 57, 58, 63, 67
- Глюцит 8 и сл., 13, 16, 17, 47, 61, 63
 Гольмий 325, 326, 335, 336
 Гомохроматография 190
 Грамицидины 152
 Гуайфенезин 118
 Гулоза 17, 57
 Гулуруоновая кислота 24, 30, 33
 Гуттион 293
- Дауномицин 154
 2,4-Д 293
 п,п'-ДДА 293
 п,п'-ДДТ 284, 285, 293
 ДДЭ 284, 293
 Дезметилдиазепам см. Нордиазепам
 Дезметилдоксепин 98
 Дезметилимипрамин 98
 Дезметилкломипрамин 98, 107
 Дезметилхлордиазепоксид 110—112
 Дезметрин 282
 Дезоксиглюкоза 13
 Дезоксирибоза 20, 68
 Дейтерий 358, 359
 Дейтерогемин 213, 214
 Дейтеропорфирин 208, 209, 212, 213, 218, 219, 222—224, 228
 Декан 388, 390
 Декстраны 19, 50, 75
 Демоксепам 110—112
 Дерматансульфат 11
 Депсиды 260
 Десипрамин 107
 Децен 388
 Диазепам 99—101, 108—111
 Диазоксон 294
 Диаллат 279
 Дибензазепин 98
 Дибензатрацен 401
 Дибензпирен 401
 Дибран 345
 Дибромметан 357
 Дикротофос 294
 Диметиламин 345
 Диметилан 279, 294
 Диметилбензол 387, 388
 Диметилбутан 385, 386
 Диметилбутен 386
 Диметилгексан 385, 387
 Диметилгексен 386, 387
 Диметилгептан 387
 Диметилпептан 386
 Диметилпентен 386
 Диметилхинол 238
 Диметилэтилбензол 385
 Диметилциклогексан 387
 Диметилциклогексен 387
 Диметилциклопентан 385, 386
 Диметинден 120
 Диметоат 286
 ДНК 183 и сл.
 гидролиз 162, 163, 195
 гель-электрофорез 183—187, 193, 196
 КХ 183, 184, 186—188
 Диоксакарб 294
 Диоксинны 297, 298
 Дисилан 345
 Дисистон 293
 Диспрозий 326, 335—337
 Диумидин 154
 Дифенилгидантоин 92, 127
 Дифенилгидрамин 119
 Дифенилпиралин 119
 Дифтордихлорметан 345
 Дифторхлорметан 345
 Дихлорбензофенон 292

Дихлоровос 294
 Диэтилбензол 388
 Диэтилпропион 129
 Диэльдрии 284, 285, 292, 293
 Додекан 383
 Доксациллин 150
 Доксепин 98, 107
 Доксиджлин 151
 Дурамицин 152
 Дурбан 293

Европий 326, 335—337
 Европетин 250

Железо 309, 315, 318, 319
 Желчные пигменты 236, 377

Золото 318, 319

Идуриновая кислота 24
 Идоза 57
 Изобутан 382—385
 Изобутен 383—385
 Изобутилбензол 388
 Изоверцетин 271
 Изомальтодекстрины 20, 24, 61, 70
 Изомальтоза 13
 Изооктан 385
 Изопентан 380—385
 Изопропилбензол 387
 Изопропилтолуол 388
 Изорамнетин 250, 254
 Изофлаваны 262
 Изофлавоны 244, 246, 256, 262, 265, 271
 Изоэвгенол 259
 Имипрамин 98, 107, 123
 Индан 388
 Инденопирен 401
 Индий 310, 311
 Индия бромид 358
 Инозит 13, 27
 Инулин 66, 67
 Иода гептафторид 345
 Иодат-ионы 327
 Иодид-ионы 323, 327, 328
 Иозамидин 149
 Ионная хроматография 321—323
 Ипазин 282
 Иттербий 337
 Иттрий 335, 336

Кадмий 316
 Калий 337
 Кальций 316
 Канамидины 146, 147
 Кандексин 153
 Кандидин 153
 Кандидинин 153
 Каннабиноиды 267
 Каптан 293
 Карбамазепин 92, 93, 105
 Карбаматов
 ВЭЖХ 288 и сл.
 ГХ 277 и сл.
 Карбарил 277, 279, 291, 293
 Карбомицин 148, 149
 Карбонат-бикарбонатные смеси как элюен-
 ты 321
 Карбофуран 279, 291

Каризопродол 122
 Каротиноидные пигменты 236
 Каротины 231
 Катехины 246, 248, 267
 Кверцетин 250
 Кельтан 293
 Кемферол 269
 Кемферолсульфат 254
 Кепон 295
 Кипертамид 93
 Кипрогептадин 120
 Кислород 345, 348—352, 357
 Клиндамицин 153
 Клозапин 130
 Кломипрамин 98, 107, 123
 Клоназепам 101, 111, 124
 Кобальт 315, 316, 320, 330—333
 Коленн 118, 127, 128
 Конкавалин А 34
 Копропорфирин 206—209, 217, 219 и сл., 228
 Коронен 401
 Кофеин 121, 122
 Кофейная кислота 249, 259
 Крезол 267
 Кремния трифторид 345
 Криптон 345, 352
 Ксантоны 244, 246, 256, 271
 Ксантофиллы 232
 Ксенон 345
 Ксиланы 6
 Ксилол 384, 390
 Ксилит 9, 11, 49, 63
 Ксилодекстрины 31, 67
 Ксилоза 9, 13, 17, 19, 20, 23, 44—46, 50, 54,
 55, 63, 66, 100
 Кумарины 244, 247, 256—259, 264, 267
 Кумаровая кислота 247, 249, 258

Лактит 47
 Лактоза 8—13, 15, 17, 22
 Ламинаридекстрины 20
 Ландрин 279
 Лантан 335—337
 Леворин 153
 Лейкомицины 149
 Лектины 34—36
 Лигнаны 273
 Лидокаин 102, 113
 Ликсоза 13, 57, 63, 100
 Линарин 264
 Линдан 284, 285, 293
 Линкомицины 153, 154
 Лоразепам 101, 124
 Лоркаинид 115
 Лютеин 232
 Лютеолинсульфат 254
 Лютеций 336, 337

Магнамицин 148
 Магний 316
 Магнийоктаметилпорфирин 230
 Мазиндол 129
 Малатион 286
 Мальвидин 260
 Мальтит 11, 47
 Мальтогексаоза 101
 Мальтодекстрины 12 и сл., 17, 20, 31, 67, 70
 Мальтопентаоза 101
 Мальтоза 6, 9, 13, 15, 17, 22, 63, 101
 Мальтотриоза 9, 17, 63, 101
 Маннаны 51
 Маннит 9 и сл., 13, 16, 17, 44, 63
 Маннобиоза 9

- Манногептулоза 229
 Маннодекстрины 31, 67
 Манноза 8, 9, 13, 17, 23, 44, 48, 51, 57, 63, 66, 101
 Маннозы производные 45, 48, 54
 Маннуриновая кислота 24
 Марганец 315
 Маридамицин 149
 Мегаломицин 149
 Медазепам 100
 Медь 315, 316, 323
 Мезогемин 213
 Мезопорфирин 207—209, 212—218, 223, 225, 228
 Мексакарбат 279
 Меобал 279
 Мепирамин 119
 Метадонгидрохлорид 128
 Метадон 127
 Метамфетамингидрохлорид 128
 Металло-мезо-тетраарилпорфирины 269
 Металлооктаалкилпорфирины 269
 Металлопорфиринкарбоновые кислоты 212—215
 BX 212, 213
 KX 214, 215
 TCX 213, 214
 Метан 348, 349, 359, 378—382
 Метацириллен 119
 Метациклин 151
 Метиламин 345
 Метилбутан 386
 Метилбутен 383, 386
 Метилгексан 385, 386
 Метилгексен 386
 Метилгептан 387
 Метилгептен 387
 Метилдекан 388
 Метилдопа 114
 Метилнонан 388
 Метиллоктан 387
 Метилпаратион 293
 Метилпентан 385, 386
 Метилпентен 385, 386
 Метилпирен 401
 Метилрезорцин 257
 Метилфолиевая кислота 117
 Метилхлорид 345
 Метилциклопентан 385, 386
 Метилэтилгексан 385, 386
 Метиокарб 279
 Метициллин 150
 Метоксиклор 293
 Метомил 293
 Микогептим 153
 Миоинозит 44
 Митрамицин 154
 Митомидины 154
 Мирекс 285, 293, 296
 Молибдена бромид 358
 Монокротофос 294
 Морфин 127, 128
 Мышьак 330, 358
 Мышьака гексафторид 345

 Надолол 115
 Натрий 337
 Нафталин 388
 Нафтохиноны 263, 271
 Небрамицин 148
 Нейраминавая кислота 42, 54, 70
 Неодим 336, 337
 Неокестоза 12
 Неомидины 146, 147

 Неон 345, 363
 Неопентан 379, 380
 Неорганических соединений 308 и сл.
 ВЭЖХ 324—326
 гель-хроматография 327—329
 ГХ 329, 330
 ионообменная хроматография 311
 плоскостная хроматография 312—314
 разделение оптических изомеров 330, 333
 Нетильмицин 148
 Нефть сырая 396 и сл.
 Ниддамицин 149
 Низин 152
 Никель 310, 315, 316
 Ниобия
 бромид 358
 хлорид 357
 Нистатин 152, 153
 Нитразепам 100, 101, 108—112
 Нитрит-ионы 322
 Нитрозамины 300, 301
 Нитрозилхлорид 345
 Новобиоцин 154
 Нонан 387, 390
 Нонахлор 284
 Нонен 387
 Нокардицины 154
 Нордиазепам 99, 108
 Нортриптин 97, 98, 107, 123
 Нуклеиновые кислоты
 гель-электрофорез 177 и сл., 193—195
 определение нуклеотидной последовательности 188
 Нуклеозиды 162 и сл.
 KX 163, 164
 TCX 165—167
 электрофорез 167
 Нуклеопротеины 191—196
 Нуклеотиды 162 и сл.
 KX 164, 165
 электрофорез 167

 Озон 345, 351
 Оксазепам 100, 108—110, 124
 Оксациллин 150
 Оксикоричные кислоты 244, 246, 256 и сл., 271
 Октаалкилпорфирины 225 и сл.
 Октан 387
 Октахлорциклопентен 284
 Оксидантоны 266
 Оксипреноловая кислота 252, 257
 Оксипренолол 104, 114
 Окситетрациклин 151
 Оксиксикон 256, 263, 267
 Оксиклордан 284
 Октен 387
 Олеандомицин 149
 Олигонуклеотиды 168, 169
 Олова
 бромид 358
 тетрагидрид 345, 357
 Ометоат 286
 Омит 293
 Оробанхин 259
 Орцин 257
 Осмий 335, 339

 Палладий 323
 Параоксон 293
 Паратион 286
 Паромидины 148
 Пепулат 279
 Пектиновая кислота 66

- Пектиновые соединения 75
 Пектолинарин 264
 Пенициллины 149, 150
 Пентан 378, 379—383, 386
 Пентатионаты 328
 Пентен 383, 386
 Пентахлоранализол 293
 Пентахлорнитробензол 293
 Пеонидин 260
 Пертан 293
 Пестициды 277 и сл.
 ВЭЖХ 288—295
 ГХ 277—288
 ГХ—МС 295—300
 карбаматы 277—280, 289—291
 нитрозированные 300, 301
 производные мочевины 294, 295
 сим-триазины 280—282, 291, 292
 ТСХ 300
 фосфорорганические 285—288, 294
 хлорированные дибензо-*п*-диоксины 297—300
 хлорорганические 282—285, 292, 293, 295, 296
 Пирамат 279
 Пирен 401
 Пиримидовые основания 163
 Пирогаллол 257
 Платина 319, 323
 Плевромутулины 154
 Полимиксины 152
 Полисахариды 28—34, 36, 44, 45, 48, 49, 51, 57—59, 75
 Полистирол 403
 Полифосфаты 328
 Полоний 318, 319
 Порфирикискарбоновые кислоты 206 и сл.
 БХ 206, 207
 КХ 209—212
 ТСХ 208, 209
 Порфирикискарбоновых кислот эфиры 216 и сл.
 БХ 217, 218
 ВЭЖХ 220—222
 КХ 222—225
 ТСХ 218—220
 Порфирины см. также Тетрапиролла производные 201 и сл.
 водонерастворимые 216 и сл.
 водорастворимые 215 и сл.
 нефти 228
 Празеодим 335—337
 Празепап 110
 Практолод 104
 Примидон 92, 93, 105
 Пристан 391, 392
 Проантоцианидины 265, 271
 Прокаинамид 102, 103, 113
 Прометазин 120
 Прометон 281, 282
 Прометрин 281, 282
 Пропазин 281, 282
 Пропап 279
 Пропан 349, 379—383
 Пропилбензол 385, 388
 Пропилен 349, 382, 383
 Пропилтолуол 388
 Пропициллин 150
 Пропоксур 104, 279, 291
 Пропранолаол 102—104, 113, 130
 Противоопухолевые препараты 115 и сл.
 Протогемин 213
 Протокатеховая кислота 257
 Протопорфирин 207, 208, 212—219, 222—225, 228
 Протриптилин 107
 Процианидины 265
 Птерокарпаны 262
 Пуриновые основания 163
 Радон 345
 Рамнетин 250
 Рамноза 10, 13, 45, 57, 58, 63, 66, 101
 Раффиноза 13, 15, 22, 53, 63
 Редкоземельные элементы 334—337
 Резорцин 257
 Рибит 17, 63
 Рибоза 13, 23, 57, 63, 66, 100
 Рибонуклеиновые кислоты
 высокомолекулярные 176—182
 гидролиз 163
 транспортные 170—176
 Рибостамицин 148
 Римоцидин 154
 Рифамицины 154
 Рифампицин 154
 Родий 317, 328, 331
 Родин 231
 Розарамидин 149
 Ролитетрациклин 151
 Роннель 293
 Ртуть 318
 Рутений 317, 328, 331
 Рутин 264
 Салициловая кислота 121, 122, 129, 252, 254, 257
 Самарий 334, 335
 Сахароза 9—13, 15—17, 22, 23, 63, 101
 Секбуметон 282
 Секбутобарбитон 106
 Секобарбитал 128
 Селена гексафторид 345
 Серы
 газообразные соединения 353, 354
 гексафторид 354, 359
 диоксид 345, 349, 353, 354
 изотопы 359
 тетрафторид 345, 354
 триоксид 354
 Свинец 316
 Свинца тетрагидрид 345
 Сиаловая кислота см. N-Ацетилнейраминовая кислота
 Силан 345, 357
 Силикаты 339—341
 Симазин 281, 282
 Симетон 282
 Симетрин 282
 Сиреневая кислота 257
 Сисомидин 147
 Скандий 334
 Скополин 267
 Смазочные масла 396, 397
 Сорбит 8
 Сорбоза 101
 Спирамицины 149
 Стахиоза 42, 66
 Стендомидин 152
 Стибин 345, 357
 Стрептомицины 146, 147
 Стрептогидрицины 154
 Субитин 152
 Сульфагуанидин 122
 Сульфамеразин 122
 Сульфаметазин 122, 123
 Сульфаниламид 122
 Сульфациридин 122
 Сульфатизол 122

Сульфат-ионы 323
Сульфонамиды 122, 130
Сурьма 318

Тагатола 19, 101
Таллий 310
Талоза 17, 19, 57
Талопираноза 9
Таннины 264
Теллура

бромид 358
гексафторид 345
хлорид 357
Теломидин 152
Темазепам 108, 110
Тенилдиамин 119
Теофиллин 105, 122
Тербутилазин 281, 282
Тербутол 279
Тербутон 282
Тербий 326, 335—337
Тербутрин 281, 282
Тетраарилпорфирины 225 и сл.
Тетраметилбензол 388
Тетрапирролы 201 и сл.
обнаружение 204, 205
стабильность 203, 204
Тетрахлорфеноксид 297
Тетрациклины 151
Тионилфторид 345, 354
Тиосульфат-ионы 328
Тиоцианат-ионы 323

Токсафен 297
Толуол 380, 385, 387, 390
Торбамидин 148
Трегалоза 13, 23
Триазиды 126
Триазины 280—282, 292
Триаллат 279
Тридакнин 35
Триметиламин 345, 253
Триметилбензол 385, 388, 390
Триметилбутан 386
Триметилгексан 387
Триметилпентан 386, 387
Тримипрамин 98
Трипелленамин 120
Трипролидин 120
Тритол 55
Трифлурамин 293, 301
Трихомицин 153
Триэтазин 282
Туберактиномицин 152
Тулий 337

Убихинон 263

Углеводов
выделение 5—7
ВЭЖХ 7 и сл.
ГЖХ 39 и сл.
ионообменная хроматография 21—25
плоскостная хроматография 60 и сл.
распределительная хроматография 18—21
ТСХ 64—70
электрофорез 74—76

Углеводороды 373 и сл.
ароматические 389, 390
высококипящие жидкие 391, 392
газообразные 378 и сл.
ГХ 378 и сл.
ЖХ 398 и сл.
многоядерные ароматические 384 и сл.

низкокипящие жидкие 384 и сл.
олефиновые 391

Углерода
диоксид 345, 347 и сл.
дисульфид 348, 349
общее содержание 358
оксид 345, 348 и сл., 357—359, 362, 363
тетрафторид 345, 359
Ундекан 388
Урана гексафторид 355
Уропорфирин 201, 206—210, 217 и сл., 228

Фармацевтические препараты 86 и сл.

ВЭЖХ 105—123
ГХ 91—104
ГХ—МС 123—125
ТСХ 125—131
Фенацетин 121, 122, 124
Фендиметразин 129
Фенетициллин 150
Фенобарбитал 92, 93, 105, 128
Фенобарбитон 92
Фенол 244, 246, 256—258, 266
Фенолкарбоновые кислоты 244, 247, 256, 257, 266, 271

Фенольные соединения 242
БХ 243—251
ВЭЖХ 268—272
ГЖХ 266—268
КХ препаративная 263—266
ТСХ 255—263
электрофорез 252—254

Фенетициллин 150
Фенилпропены 256, 259, 266
Фенитоин 92, 93, 105
Фенметразин 129
Феноксиметилпенициллин 150
Фентермин 129
Фентурид 92
Фенфлурамин 129
Феофитин 232
Ферроцианиды 328
Феруловая кислота 249
Фитан 391, 392
Фитол 233
Флавоноиды
БХ 244—248
ТСХ 260—263
Флавонолы 246 и сл., 253—256, 260, 261, 265, 266, 268
Флавононы 244—248, 264—266, 269
Флавоны 244, 246, 249 и сл., 260 и сл., 271, 272

Флороглюцин 247, 257, 258
Флунизатепам 108, 110, 111
Флуорантен 401
Флуоресцентные индикаторы 398
Флуразепам 110, 111, 124
Фоксим 286
Фолиевая кислота 117
Формиат-ионы 322
Фортимицины 147
Фосген 345, 354
Фосдрин 293
Фосфамидон 294
Фосфат-ионы 322, 338
Фосфин 345, 357
Фосфора
пентафторид 345
трифторид 345
Фруктоза 8 и сл., 45, 57, 63, 68
Фтор 345, 355
Фтора оксид 345, 355
Фтороформ 345

Фторуглероды 355, 356
Фукоза 13, 45, 57, 63, 66, 68—70, 101

Хальконы 246—248, 264, 265, 269
Хинидин 129
Хитин 32
Хлор 345, 354, 355
Хлора
 диоксид 345, 355
 дифторид 355
 монооксид 355
 тетрафторид 355
 пентафторид 355
Хлоразепат 100
Хлорамфеникол 153
Хлордезметилдиазепам 101, 124
Хлордиазепоксид 98, 99, 108—112
Хлорид-ионы 322, 323
Хлорпрофам 279
Хлорсиланы 358
Хлортермин 129
Хлортетрациклин 151, 152
Хлорфенвинфос 286
Хлорфенурмин 120
Хлорфенолы 256
Хлорфиллиды 232
Хлорофиллы 201, 202, 230—236
 КК 233 и сл.
 ТСХ 230 и сл.
Хлорфоксям 286
Хлорциан 345
Хлороциклизин 120
Хризен 401
Хромат-ионы 329
Хондронсульфат 14, 26, 33, 66

Целлобиоза 8, 9, 24
Целлодекстрина 32, 67
Церий 335, 336

Цефалексин 151
Цефалоглицин 151
Цефалоридин 151
Цефалоспорины 150 и сл.
Цефалотин 151
Цефамидин 151
Цефрандин 151
Цианидины 249, 253
Циклогексан 386
Циклодекстрины 14, 18
Циклопентан 380, 386
Цинк 315
Цинхорин 246
Цирконий 328, 329
Циркония
 бромид 358
 хлорид 357

Эвгенол 245, 259
Эрбий 325, 326, 335—337
Эритроза 20, 53, 57
Эритромицин 148, 149
Эритрит 13, 17, 41, 55, 70
Эскулин 265
Этан 349, 379 и сл.
Этилбензол 386, 390
Этилбутен 385, 386
Этилгексан 387
Этиленгликоль 55
Этилен 349, 350, 382, 383
Этилпентан 386
Этилтолуол 388
Этилхлорид 345
Этилциклопентан 387
Этосукцимид 92, 105
Этотон 92
«Эффект перхлората» 318, 319

Ювенимицин 149

Содержание

Глава 7. Углеводы. Ш. Чармс	5
7.1. Введение	5
7.2. Колоночная хроматография	5
7.2.1. Классические методы. Использование в препаративной хроматографии	6
7.2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	7
7.2.2.1. Тонкоизмельченный силикагель	8
7.2.2.2. Привитые фазы	11
7.2.2.3. Лигандный обмен на катионообменных смолах	16
7.2.3. Распределительная хроматография на ионообменных смолах	18
7.2.4. Ионообменная хроматография	21
7.2.4.1. Ионный обмен на смолах	21
7.2.4.2. Хроматография на декстрановых и целлюлозных ионообменниках	25
7.2.5. Стерическая эксклюзионная хроматография	27
7.2.5.1. Анализ молекулярно-массового распределения	27
7.2.5.2. Сорбенты для стерической эксклюзионной хроматографии	28
7.2.5.3. Элюенты и условия хроматографирования	31
7.2.6. Аффинная хроматография	34
7.2.7. Методы детектирования при колоночной хроматографии	36
7.3. Газожидкостная хроматография	39
7.3.1. Общие экспериментальные условия	40
7.3.2. Идентификация и количественное определение компонентов	43
7.3.3. Производные	44
7.3.3.1. Метилированные метилгликозиды	44
7.3.3.2. Ацетилированные полиолы	46
7.3.3.3. Полностью метилированные полиолы	49
7.3.3.4. Ацетилированные альдонитрилы	50
7.3.3.5. Триметилсилильные производные	51
7.3.3.6. Трифторацетаты	56
7.3.3.7. Другие летучие производные	58
7.3.4. Использование масс-спектрометрии	59
7.4. Плоскостная хроматография	60
7.4.1. Хроматография на бумаге	60
7.4.2. Тонкослойная хроматография	64
7.4.2.1. ТСХ на целлюлозе	66
7.4.2.2. ТСХ на кизельгуре	67
7.4.2.3. ТСХ на силикагеле	67
7.4.3. Обнаруживающие реагенты	70
7.5. Электрофорез	74

75.1. Электрофорез на бумаге	74
75.2. Другие электрофоретические методы	75
Литература	76
Глава 8. Фармацевтические препараты. Л. Фишбейн	88
8.1. Введение	88
8.2. Газовая хроматография	91
8.2.1. Антikonвульсанты	91
8.2.2. Барбитураты	93
8.2.3. Трициклические антидепрессанты	96
8.2.4. Бензодиазепины	98
8.2.5. Антиаритмические препараты	102
8.2.6. Блокаторы β -адренэргических рецепторов	103
8.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	105
8.3.1. Антikonвульсанты	105
8.3.2. Барбитураты	106
8.3.3. Трициклические антидепрессанты	106
8.3.4. Бензодиазепины	108
8.3.5. Антиаритмические средства и β -адреноблокаторы	113
8.3.6. Противоопухолевые препараты	115
8.3.7. Смеси фармацевтических препаратов	118
8.4. Газовая хроматография — масс-спектрометрия	123
8.4.1. Трициклические антидепрессанты	123
8.4.2. Бензодиазепины	124
8.4.3. Фенацетин и ацетаминофен	124
8.5. Тонкослойная хроматография	125
8.5.1. Лекарственные препараты основного, нейтрального и кислого характера	125
8.5.2. Барбитураты	126
8.5.3. Поиск наркотиков в образцах мочи	127
8.5.4. Антиаритмические средства и β -адреноблокаторы	129
8.5.5. Ион-парная тонкослойная хроматография	130
8.5.6. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)	130
Литература	131
Глава 9. Антибиотики. Дж. Г. Вагман, М. Дж. Вейнстейн	143
9.1. Введение	153
9.2. Хроматографические методы идентификации антибиотиков	144
9.3. Специфические методы	146
9.3.1. Аминогликозиды	146
9.3.2. Макролиды	148
9.3.3. Пенициллины	149
9.3.4. Цефалоспорины	150
9.3.5. Тетрациклины	151
9.3.6. Полипептиды	152
9.3.7. Полиены	152
9.3.8. Другие антибиотики	153
Литература	154
Глава 10. Нуклеиновые кислоты. Г. Дж. Каулинг	162
10.1. Введение	162
10.2. Азотистые основания, нуклеотиды и нуклеозиды	162
10.2.1. Состав нуклеиновых кислот	162
10.2.2. Хроматография на колонках	163

10.2.3. Тонкослойная хроматография	165
10.2.4. Электрофорез	167
10.2.5. Гель-хроматография	167
10.3. Олигонуклеотиды	168
10.3.1. Ионообменная хроматография	168
10.4. Транспортные РНК	170
10.5. Высокомолекулярные РНК	176
10.5.1. Аффинная хроматография	176
10.5.2. Гель-электрофорез	177
10.6. Дезоксирибонуклеиновые кислоты	183
10.6.1. Хроматография на гидроксипатите	183
10.6.2. Гель-электрофорез	183
10.6.3. Хроматография на сорбенте RPC5	187
10.7. Определение нуклеотидной последовательности	188
10.8. Нуклеопротенды	191
10.8.1. Структура хроматина	193
Литература	197
Глава 11. Порфирины и родственные им производные тетрапиррола. Дэвид Дольфин	201
11.1. Структура и химические свойства тетрапирролов	201
11.1.1. Стабильность	203
11.1.2. Обнаружение	204
11.2. Водорастворимые соединения	206
11.2.1. Порфиринкарбоновые кислоты	206
11.2.1.1. Бумажная хроматография	206
11.2.1.2. Тонкослойная хроматография	208
11.2.1.3. Колоночная хроматография	209
11.2.2. Металлопорфиринкарбоновые кислоты	212
11.2.2.1. Бумажная хроматография	212
11.2.2.2. Тонкослойная хроматография	213
11.2.2.3. Колоночная хроматография	214
11.2.3. Водорастворимые порфирины, лишенные карбоксильных групп	215
11.3. Водонерастворимые соединения	216
11.3.1. Порфирины	216
11.3.1.1. Эфиры порфиринкарбоновых кислот	216
11.3.1.2. Октаалкил- и мезо-тетраарилпорфирины	225
11.3.2. Металлопорфирины	227
11.3.2.1. Эфиры металлопорфиринкарбоновых кислот	227
11.3.2.2. Металлооктаалкил- и металло-мезо-тетраарилпорфирины	229
11.3.3. Хлорофиллы и родственные им фотосинтезирующие пигменты	230
11.3.3.1. Тонкослойная хроматография	231
11.3.3.2. Колоночная хроматография	232
11.3.4. Желчные пигменты	236
Литература	237
Глава 12. Фенольные соединения. Д. Б. Харборн	242
12.1. Введение	242
12.2. Бумажная хроматография	242
12.2.1. Системы растворителей	243
12.2.2. Цветные реакции	245
12.2.3. Флавоноиды	245

12.2.4. Антоцианы	248
12.2.5. Флавонолы и флавоны	250
12.2.5.1. Метилловые эфиры флавонолов	250
12.2.5.2. Флавонолглюкозиды	251
12.2.5.3. С-Гликозилфлавоны	252
12.3. Электрофорез на бумаге	255
12.4. Тонкослойная хроматография	255
12.4.1. Введение	255
12.4.2. Сорбенты и растворители	258
12.4.3. Простые фенольные соединения	260
12.4.4. Флавоноиды	263
12.4.5. Оксихиноны	263
12.5. Крупномасштабная колоночная хроматография	263
12.5.1. Сравнительная характеристика методов	264
12.5.2. Полиамид	265
12.5.3. Сефадекс	266
12.6. Газо-жидкостная хроматография	268
12.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография	272
12.8. Заключение	273
Литература	
Глава 13. Пестициды. Л. Фишбейн	277
13.1. Введение	277
13.2. Газовая хроматография	277
13.2.1. Карбаматы	280
13.2.2. <i>симм</i> -Триазины	282
13.2.3. Хлорорганические пестициды	285
13.2.4. Фосфорорганические пестициды	288
13.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	289
13.3.1. Карбаматы	291
13.3.2. <i>симм</i> -Триазины	292
13.3.3. Хлорорганические пестициды	294
13.3.4. Фосфорорганические пестициды	294
13.3.5. Производные мочевины	295
13.4. Хроматомасс-спектрометрия	295
13.4.1. Хлорорганические пестициды	297
13.4.2. Хлорированные дибензо- <i>п</i> -диоксины	300
13.5. Тонкослойная хроматография	300
13.6. Нитрозированные пестициды и загрязнение окружающей среды микроколичествами нитрозаминов	301
Литература	
Глава 14. Неорганические соединения. М. Ледерер	308
14.1. Введение	308
14.2. Равновесие комплексообразования	316
14.3. Медленно устанавливающиеся равновесия комплексообразования	318
14.4. Гидрофобная адсорбция и «эффект перхлората»	320
14.5. Образование ионных пар или комплексов, имеющих внешнюю координационную сферу	321
14.6. Ионная хроматография	324
14.7. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	327
14.8. Гель-хроматография	329
14.9. Газовая хроматография	330
14.10. Разделение оптических изомеров	331
14.11. Разделение координационных комплексов	

14.12. Скандий, иттрий, редкоземельные металлы и актиний	334
14.13. Конденсированные фосфаты	335
14.14. Силикаты	339
Литература	341
Глава 15. Неуглеводородные газы. Ярослав Янак	344
15.1. Введение	344
15.2. Разделение газов и его применение	346
15.2.1. Общие соображения	346
15.2.2. Постоянные газы	349
15.2.3. Промышленные газы	351
15.2.4. Газы биологического происхождения	352
15.2.5. Инертные газы	352
15.2.6. Газообразные соединения азота	352
15.2.7. Газообразные соединения серы	353
15.2.8. Соединения галогенов	354
15.2.9. Газообразные гидриды и прочие газы	356
15.3. Разделение изотопов и спиновых изомеров	358
15.4. Анализ микроколичеств	359
15.4.1. Концентрирование микрокомпонентов, содержащихся в га- зах	361
15.4.2. Количественный микроанализ при неизвестном составе мат- рицы пробы	363
15.4.3. Увеличение чувствительности детекторов	365
Литература	366
Глава 16. Углеводороды. Э. Р. Адлард	373
16.1. Введение	373
16.2. Газовая хроматография	373
16.3. Аппаратура	375
16.4. Анализ газов	378
16.5. Смеси летучих жидких углеводородов	384
16.6. Смеси углеводородов керосиновых и газойлевых фракций	392
16.7. Многоядерные ароматические углеводороды	394
16.8. Смазочные масла и сырая нефть	396
16.9. Жидкостная хроматография	398
16.10. Тонкослойная хроматография	404
16.11 Заключение	406
Литература	408
Предметный указатель	411

Уважаемый читатель!

**Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир».**

Монография

Ширлей Чармс, Лоуренс Фишбейн, Джеральд Вагман и др.

ХРОМАТОГРАФИЯ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ МЕТОДА

Редактор Эрих Хефтман

Часть 2

Старший научный редактор Р. И. Краснова

Научный редактор Б. М. Комарова

Младший редактор И. С. Ермилова

Художник Г. М. Чеховский

Художественный редактор М. Н. Кузьмина

Технический редактор Т. А. Максимова

Корректор Н. В. Андреева

ИБ № 5433

Сдано в набор 18.06.86. Подписано к печати 29.09.86. Формат 60×90^{1/16}.

Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура литературная.

Объем 13,25 бум. л. Усл. печ. л. 26,50. Усл. кр.-отт. 26,50. Уч.-изд. л. 26,40.

Изд. № 3/4144. Тираж 7350 экз. Зак. 276. Цена 1 р. 70 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» 129820, ГСП, Москва, И-110,

1-й Рижский пер., 2

**Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном
комитете СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли.
113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.**

