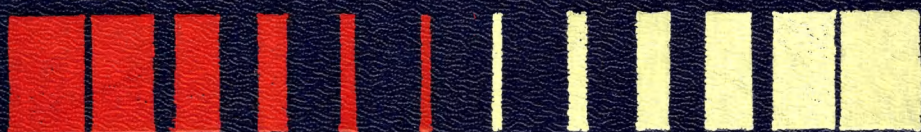


Хроматография



Практическое
приложение
метода

1

Хроматография

Практическое
приложение
метода

Journal of Chromatography Library—volume 22A, volume 22B

Chromatography

Fundamentals and Applications of
Chromatographic and Electrophoretic Methods

Part A: Fundamentals and Techniques

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

1

*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

Хефтман Э., Кастер Т., Нидервизер А., Кацимпулас Н.,
Куксис А., Кротью Р., Рональд Р.

Х94 Хроматография. Практическое приложение метода.
В 2-х ч. Ч. 1. Пер. с англ./Под ред. Э. Хефтмана. — М.:
Мир, 1986. — 336 с., ил.

Монография, написанная коллективом авторов США, Канады и Швейцарии, под редакцией американского ученого Э. Хефтмана посвящена хроматографии — 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 части 1 рассмотрена хроматография аминокислот, олигопептидов, белков, липидов, терпенов и стероидов.

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

X 1804000000-358
041(01)-86 — 91-86, ч. 1

ББК 24.5

Монография

Эрих Хефтман, Томас Кастер, Алоис Нидервизер и др.

ХРОМАТОГРАФИЯ

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ МЕТОДА

Часть 1

Старший научный редактор Р. И. Краснова, Младший научный редактор И. И. Землячева.
Художник Г. М. Чековский. Художественный редактор М. Н. Кузьмина.
Технический редактор Т. А. Максимова. Корректор В. И. Киселева.

ИБ № 5431

Сдано в набор 17.02.86. Подписано к печати 24.07.86. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 10,50 бум. л. Усл. печ. л. 21,00. Усл. кр.-отт. 21,00. Уч.-изд. л. 23,81. Изд. № 3/4143. Тираж 7350 экз. Зак. 143. Цена 1 р. 60 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.

Редакция литературы по химии

© Elsevier Scientific Publishing Company, 1983

© перевод на русский язык, «Мир», 1986

Предисловие редактора перевода

Хроматография в настоящее время является наиболее широко используемым аналитическим методом. Она активно применяется в научных исследованиях, в различных отраслях промышленности, в медицине, а также для контроля окружающей среды. Исследуя состав разнообразных сложных смесей, хроматография выполняет одну из важнейших задач химической науки, о которой говорил еще М. В. Ломоносов в «Слове о пользе химии». «К точному и подробному познанию какой-либо вещи, — писал он в 1751 г., — должно знать части, которые оную составляют. И хотя в нынешние века изобретенные микроскопы силу зрения нашего так увеличили, что в едва видимой пылинке весьма многие части ясно распознать можно, однако сим полезные инструменты служат только к исследованию органических яв частей, каковы суть весьма тонкие и невидимые простым глазом пузырьки и трубочки, составляющие твердые части животных и растущих веществ; а тех частиц, из которых состоят смешанные материи, особливо зрению представить не могут. И потому познание оных только через химию доходить должно».

Важными особенностями хроматографии, открытой в начале нашего столетия М. С. Цветом, являются высокая селективность, большая чувствительность и универсальность. Хроматография применима для исследования практически всех веществ: газообразных, жидких и твердых. Необычайно широк и круг анализируемых этим методом объектов — от полимеров, пищевых продуктов, микроорганизмов, белков, нефти, металлов, руд до атмосферы планет Солнечной системы и состава лунного грунта.

Хроматография, таким образом, вносит важный вклад в решение одного из важнейших направлений химической науки — аналитической химии. Новое «хроматографическое зрение» химика позволило сделать много важных открытий. В частности, свыше десяти Нобелевских премий было присуждено за исследования, в которых активно использовались хроматографические методы.

Для выполнения хроматографического анализа применяется стандартное, коммерчески доступное оборудование, причем процесс анализа как в промышленности на потоке, так и в условиях лаборатории часто проводится в автоматическом режиме.

Быстрое развитие хроматографических методов, иногда в течение всего нескольких лет, приводит к существенному изменению используемых на практике методов и к изменению методик, применяемых в анализе химических соединений определенного класса. Поэтому для аналитика-хроматографа, пожалуй, в большей мере, чем для работающего в другой области аналитической химии, необходимо внимательно следить за появлением и практическим использованием новых методов и аналитических приемов в хроматографии. Важную роль в этом направлении хроматографисту могут оказать монографии, в которых рассматривается приложение метода к аналитическому исследованию важнейших классов химических соединений.

Двухтомная монография «Хроматография» под редакцией Э. Хефтмана, вышедшая недавно за рубежом четвертым изданием, является ценным руководством, особенно по хроматографическому анализу важных групп химических соединений. Переведенная на русский язык часть книги, в которую вошли полностью 2-й том и одна глава из 1-го тома, охватывает важные классы соединений, представляющие интерес для биохимии, медицины, фармацевтической промышленности, сельского хозяйства, химической промышленности и других отраслей народного хозяйства.

Отдельные главы книги написаны исследователями, являющимися признанными авторитетами в данной области. Несомненно, достоинством книги является то, что хроматографическое определение отдельных классов соединений рассмотрено с привлечением различных хроматографических и электромиграционных методов.

Содержание книги представляет интерес для широкого круга читателей-аналитиков и всех специалистов, использующих хроматографические методы в своей работе. Мы надеемся, что перевод книги Э. Хефтмана на русский язык будет способствовать повышению эффективности практической работы многих химиков и аналитиков и способствовать дальнейшему расширению областей применения и развитию хроматографических методов.

В. Березкин

Предисловие

Настоящая книга представляет собой четвертое издание классического труда по хроматографии, выпускаемого под редакцией Эриха Хефтмана. Предисловия к предыдущим изданиям, первое из которых вышло в свет 20 лет назад, были написаны ведущими исследователями в данной области. Я не принадлежу к их числу, хотя и имел некоторое отношение к хроматографии.

Вспоминаю свою первую встречу с Лазло Цехмейстером — одним из выдающихся основоположников метода хроматографии, состоявшуюся примерно в 1940 г. во время одного из его первых визитов в Беркли (возможно, это было вообще его первое посещение Беркли). В это время истек срок моей работы у Гильберта Ньютона Льюиса в качестве его ассистента. Льюис представил меня Цехмейстеру и при этом выразил неподдельное восхищение хроматографическим методом разделения веществ, который, как он мне сказал, был открыт много лет назад русским ученым с легкозапоминающейся фамилией Цвет. За год или два до этой встречи мы с Льюисом предприняли попытку усовершенствовать метод разделения близкородственных редкоземельных элементов, и поэтому нас чрезвычайно заинтересовало все, что рассказал нам Цехмейстер о хроматографии.

Мое следующее соприкосновение с хроматографией произошло лишь спустя два года. Во время войны я работал в лаборатории металлургии Чикагского университета. Передо мной стояла задача разработать промышленный метод выделения тогда еще нового элемента плутония, присутствовавшего в незначительных количествах в смеси урана и высокоактивных продуктов его распада, причем технологическая схема должна была предусматривать дистанционное управление процессом. Вспомнив свои беседы с Цехмейстером, я включил колоночную хроматографию на неорганических сорбентах в число различных методов разделения, которые предстояло исследовать работавшей со мной группе химиков. Однако такой подход не выдержал конкуренции со стороны более понятного в то время метода соосаждения.

Тем не менее всего лишь через несколько лет мы вновь обратились к методу хроматографии, и на этот раз нас ожидал потрясающий успех. Для разделения трансплутониевых элементов, катионы которых преимущественно трехзарядны, и для

их отделения от редкоземельных элементов мы использовали колоночную хроматографию на органических ионообменных смолах. Лично для меня результаты этих экспериментов имели особое значение, поскольку открывали возможность убедить даже скептиков в справедливости «актиноидной концепции» расположения трансурановых элементов в периодической таблице.

Естественно, мои заметки о хроматографии касаются весьма частной проблемы в стремительно разросшейся области исследований — области, всесторонне представленной в этом новом издании книги. Набор современных методов и способов хроматографии столь разнообразен, а диапазон их использования в различных областях химии, биохимии и в других сферах деятельности столь широк, что их невозможно отразить в предисловии. Некоторое представление об этом можно составить, взглянув на содержание книги. Представленные здесь обзоры написаны высококвалифицированными специалистами, что обеспечивает широкий охват различных аспектов рассматриваемых проблем.

Это новейшее издание книги по хроматографии будет с радостью встречено всеми исследователями, работа которых связана с разделением различных веществ, а также послужит хорошим справочником и для более широкого круга читателей.

Гленн Т. Сиборг

Беркли, Калифорния
июль 1982 г.

Предисловие редактора американского издания

В 1954 г. при поддержке отдела аспирантуры министерства сельского хозяйства США я начал читать курс хроматографии для работающих в районе Вашингтона специалистов, и с тех пор меня не покидала мысль ознакомить более широкую аудиторию с теорией и практикой хроматографии и электрофореза. Прекрасно сознавая, что один человек не в состоянии выбрать самые важные аспекты проблем, рассматриваемых в весьма обширной литературе по этим вопросам, я обратился за помощью к некоторым наиболее известным в своей области специалистам по хроматографии и электрофорезу, и в результате наших коллективных усилий в 1961 г. вышла в свет первая книга под названием «Хроматография». Быстрый рост объема литературы, а также хороший прием, оказанный первому изданию книги, побудили меня выпустить второе издание в 1967 г. «Хроматография» была вновь переработана в 1975 г., после того как произошло слияние книжного издательства «Renhold Publishing Corporation», опубликовавшего первые два издания книги, с издательством «Van Nostrand».

И вот снова пришло время пересмотреть материал с позиций современного состояния проблем, связанных с хроматографией и электрофорезом. Однако поскольку за период с 1975 г. произошли серьезные изменения в этой области, а также в силу того, что теперь публикацию «Хроматографии» осуществляет издательство «Elsevier Scientific Publishing Company», мне хотелось, чтобы это была новая книга, а не переработанное издание. В подготовке этой книги, сохранившей удачный формат предыдущих изданий, приняли участие лишь несколько моих прежних соавторов. Я попытался на конкретных примерах продемонстрировать использование наиболее современных и важных методов разделения веществ и по возможности исключить описание уже устоявшихся или устаревших методов. Полагаю, что новому коллективу авторов удалось в новом свете представить области их исследований.

Мои функции как редактора издания состояли в том, чтобы определить структуру книги, привлечь к ее написанию известнейших в своей области преподавателей и исследователей, посоветовать, какие моменты следует отразить или опустить в той или иной главе, а затем выработать некую приемлемую для учебника форму изложения материала, которая вместе с тем позволила бы сохранить индивидуальность точек зрения каждого из авторов. В общем, я сделал все, что было возмож-

но при работе с людьми, которые обладают весьма своеобразным характером и по праву гордятся своими достижениями. Я чрезвычайно признателен моим соавторам не только за их личный вклад в эту книгу, но и за помощь в ее редактировании.

Эрих Хефتمان

Оринда, Калифорния

Предисловие к русскому изданию

Это четвертое издание книги, которая к настоящему времени приобрела репутацию настольного справочника по хроматографии. Что касается предыдущего издания, то оно состоит из двух частей, одна из которых посвящена теории и аппаратурному оформлению методов разделения веществ, а вторая — практическому приложению хроматографии. Поскольку первая часть по своему содержанию во многом дублирует уже опубликованные в Советском Союзе книги, издательство «Мир» решило включить в настоящее издание только мою вводную главу из этой части; вторая часть приведена полностью.

Конечно, любому автору хотелось бы, чтобы его книга дошла до широкой аудитории, и поэтому ему очень приятно увидеть свою работу переведенной на другие языки. Особое удовольствие, которое я испытываю, представляя читателям русский перевод книги, обусловлено еще двумя причинами. Во-первых, своим появлением в научном арсенале хроматография обязана России, и поэтому представляется вполне естественным, чтобы советские ученые получили еще более глубокое и всестороннее представление о современном состоянии исследований в этой области. Во-вторых, появлению этого перевода способствовал один из известнейших советских хроматографистов-практиков — профессор В. Г. Березкин.

Когда наши советские коллеги будут читать эту книгу, они, несомненно, еще раз осознают и грандиозность тех вершин, которых достиг метод, предложенный русским ботаником М. С. Цветом всего 80 лет назад, и свое законное место на переднем крае теоретических и прикладных исследований в области хроматографии.

Эрих Хефتمان

Оринда, Калифорния

Глава 1

Обзор методов хроматографии и электрофореза

Эрих Хефтман

1.1. Классификация

Хроматография и электрофорез — два наиболее важных дифференциальных миграционных метода [1—3].

Большинство химических процессов, в том числе и химический анализ, включают стадию разделения смесей на индивидуальные компоненты, например фильтрацию, экстракцию, перегонку или электролиз. Дифференциальные миграционные методы применяются для разделения смесей путем принудительного перемещения их компонентов в различные участки системы.

На рис. 1.1 представлена схема разделения смеси трех компонентов (*A*, *B* и *B*), первоначально занимавшей прямоугольную зону, путем ее перемещения направо. Если миграционный путь достаточно велик по сравнению с шириной исходной зоны образца (рис. 1.1, *a*), наиболее подвижный компонент *A* полностью отделится от менее подвижного компонента *B*, который в свою очередь «обгонит» наиболее медленно перемещающийся компонент *B*. Однако если ширина исходной зоны образца соизмерима с длиной миграционного пути (рис. 1.1, *b*), от смеси отделится только некоторое количество наиболее и наименее подвижных компонентов (соответственно *A* и *B*), а компонент *B* вообще не удастся выделить. Если смесь подается в систему непрерывно (рис. 1.1, *в*), в чистом виде удастся получить лишь небольшое количество компонента *A*, а компоненты *B* и *B* в этом случае выделить невозможно.

В соответствии с изложенным различают три типа дифференциальных миграционных методов. Если необходимо выделить компоненты смеси в виде индивидуальных веществ, выбирают метод миграции из узкой зоны (рис. 1.1, *a*), а в аналитических целях можно использовать миграцию из широкой зоны (рис. 1.1, *b*), т. е. фронтальный анализ*, и даже миграцию при

* Этот метод обычно называют импульсным фронтальным (см. Яновский М. И., Газиев Г. А. В кн.: Газовая хроматография. — М.: Наука, 1964, с. 79), а метод, идея которого представлена на рис. 1.1, *в*, — фронтальным (см., например, Шай Г. Теоретические основы хроматографии газов. — М.: ИЛ, 1963). — *Прим. ред.*

непрерывной подаче смеси веществ, или метод непрерывного потока (рис. 1.1, в) [4]. Дифференциальная миграция из широкой зоны применяется, в частности, при проведении анализа белков сыворотки методом электрофореза с подвижной границей, а метод непрерывного потока — при определении состава растворенных в воде солей с помощью ионообменной хроматографии. Однако оба этих метода анализа к настоящему времени устарели, и поэтому мы рассмотрим только зональные

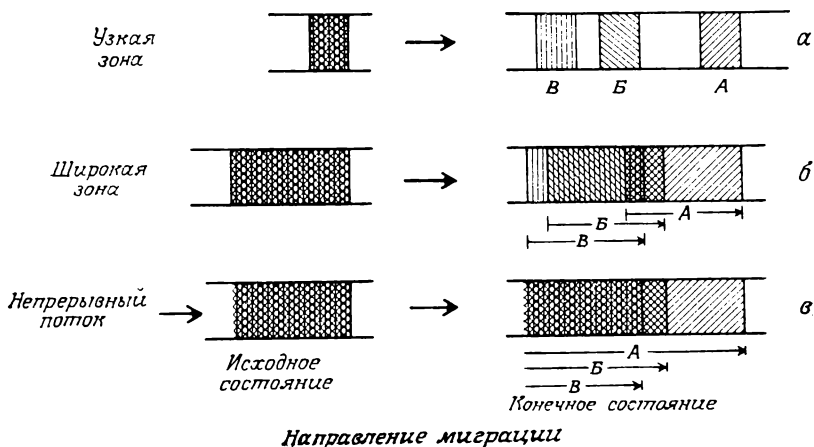


Рис. 1.1. Схема дифференциальной миграции трех компонентов смеси.

Если исходная зона образца достаточно узкая (а), компоненты полностью разделяются, при более широкой исходной зоне (б) области распределения компонентов перекрываются. При непрерывном потоке образца (в) в чистом виде можно получить только наиболее подвижный компонент А.

методы, т. е. основанные на миграции веществ из узких зон, причем основное внимание уделим современной хроматографии и зонному электрофорезу, а такие методы, как, например, зональная очистка и зональное ультрацентрифугирование, вообще исключим из рассмотрения.

Дифференциальная миграция веществ из узкой зоны происходит под действием некой движущей силы. В хроматографии такой силой является поток жидкости или газа, и по этому признаку хроматографические методы целесообразно разделить на два класса: жидкостную (ЖХ) и газовую хроматографию (ГХ). В электрофорезе движущей силой является внешнее электрическое поле. Разделяемые вещества перемещаются в определенной среде, обычно стабилизированном растворе электролита. Хроматографическое разделение проводится в жидкой или твердой среде, т. е. протекает в двухфазной системе, в которой подвижная фаза (жидкость или газ) перемещается отно-

сительно жидкой или твердой неподвижной фазы. В соответствии с природой подвижной и неподвижной фаз различают следующие типы хроматографии*: жидко-жидкостную (ЖЖХ), жидко-твердофазную (ЖТХ), газо-жидкостную (ГЖХ) и газо-твердофазную (ГТХ).

Взаимодействие разделяемых веществ с неподвижной фазой в той или иной степени препятствует их свободному перемещению с потоком жидкости или газа и, как следствие, снижает скорость их движения. Иногда довольно трудно определить механизм взаимодействия вещества с неподвижной фазой, и поэтому для обозначения таких процессов используют расплывчатый термин «сорбция», а неподвижную фазу называют «сорбентом». В процессе хроматографического разделения молекулы веществ многократно проходят этапы сорбции и десорбции, т. е. скорость их перемещения относительно неподвижной фазы постоянно меняется от нуля до скорости потока газа или жидкости. Этот динамический процесс и лежит в основе хроматографического разделения. В рамках упрощенной «тарелочной модели» его описание подчиняется тем же законам, что и фракционная перегонка, и мерой его эффективности является высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ).

Термин «хемосорбция» используется некоторыми авторами для обозначения специфических взаимодействий вещества с сорбентом, таких, как ионный обмен, окислительно-восстановительные процессы, образование комплексов и т. п. Так, например, при хроматографическом разделении олефинов на сорбентах, пропитанных нитратом серебра, имеет место хемосорбция, обусловленная образованием π -комплексов.

Твердые неподвижные фазы удерживают компоненты смеси в результате адсорбции, абсорбции и других типов взаимодействия, а жидкие неподвижные фазы сорбируют их, выступая, как правило, в роли растворителя. При проведении электрофореза и многих типов хроматографического разделения неподвижность жидкой фазы обычно обеспечивается путем сорбции на инертном твердом носителе — так называемой подложке. В процессе газовой или жидкостной хроматографии разделяемые вещества распределяются между подвижной фазой и неподвижной жидкостью. Согласно общепринятой схеме класси-

* В советской научной литературе жидко-твердофазную хроматографию называют также жидко-адсорбционной, а газо-твердофазную — газо-адсорбционной (см., например, *Киселев А. В., Яшин Я. И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография.* — М.: Химия, 1979).

Отметим также, что в иностранной и советской литературе все чаще вместо термина «газо-жидкостная хроматография» используется термин «газо-жидкотвердофазная хроматография», что позволяет отразить все основные фазы, принимающие участие в хроматографическом процессе. — *Прим. перев.*

фикации хроматографических процессов, построенной в соответствии с принципом процесса разделения, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную, вытеснительную, аффинную и другие типы хроматографии, хотя обычно осуществляется одновременно несколько из указанных процессов.

Фактически названия многих хроматографических и электрофоретических методов отражают не механизм процесса, а характер фаз или способ разделения. Буквальное восприятие таких названий очень часто вводит в заблуждение начинающих исследователей, и поэтому неоднократно предлагалось заменить такого рода названия на более информативные. Однако поскольку большинство предпринятых с благими намерениями попыток упразднить популярные названия потерпело неудачу, представляется более разумным расшифровать их, чем вводить новые [5]. Ведь в конце концов даже термин «хроматография» можно признать неподходящим, поскольку методы разделения этого класса не имеют ничего общего с «написанием в цвете».

1.2. Колоночная хроматография

Вообще говоря, колоночную хроматографию следовало бы называть жидкостной колоночной хроматографией, чтобы отличить ее от газовой, которая также проводится на колонках. Однако, поскольку в газовой хроматографии иное аппаратное оформление принципиально исключено, термин «колоночная хроматография» служит для обозначения методов хроматографии на колонках, в которых подвижной фазой является жидкость. Неподвижную фазу, которая представляет собой более или менее тонкоизмельченное твердое вещество, упаковывают в определенного вида трубку. В полученную в результате колонку вводят образец, и в том же направлении подают растворитель. В оптимальных условиях компоненты смеси переносятся подвижной фазой (элюентом) с различной скоростью, которая зависит от их относительного сродства к неподвижной и подвижной фазам (рис. 1.2).

Если трубка изготовлена из прозрачного материала, а компоненты смеси окрашены, движение хроматографических зон, или полос, вдоль колонки можно наблюдать непосредственно (рис. 1.2, *a*). На заре хроматографии экспериментатор по окончании разделения извлекал носитель из колонки, разрезал его на зоны и отдельно экстрагировал каждое вещество, используя иногда для обнаружения зон УФ-освещение или соответствующие цветные реакции. В настоящее время такая процедура извлечения веществ из колонки используется только при применении так называемых «сухих колонок», представляющих собой наполненные сорбентом тонкостенные пластмассовые труб-

ки в форме колбасок, которые можно легко разрезать на зоны по окончании разделения. В общем случае разрешающая способность колонки определяется ее длиной, а емкость — внутренним диаметром. В уже забытом варианте препаративной хроматографии использовались колонки, собранные из отдельных секций с последовательно уменьшающимся внутренним диаметром (составные колонки).

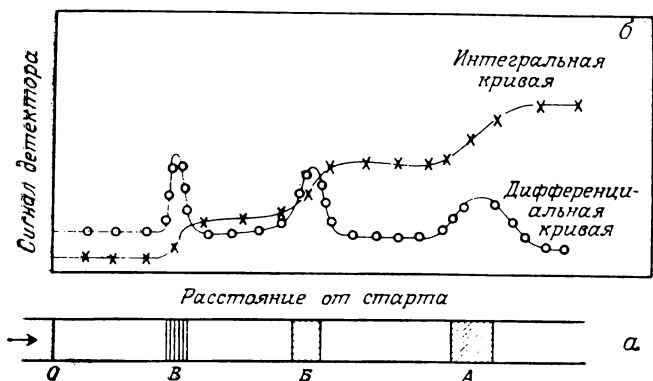


Рис. 1.2. Изображение хроматограммы или электрофореграммы.

С потоком элюента или под действием электрического поля компоненты А, Б и В исходной смеси (0) перемещаются в направлении, указанном стрелкой. Полученная картина взаимного расположения зон представляет собой хроматограмму или электрофореграмму (а), которые с помощью сканирующего устройства можно изобразить графически (б). В проявительной или газовой хроматографии результаты обнаружения компонентов смеси на выходе из колонки представляют в виде соответствующей кривой, которую также называют хроматограммой. Кривая, построенная в координатах концентрация компонента — время, прошедшее с начала разделения, объем элюата или расстояние от старта, представляет собой серию пиков (дифференциальная кривая). Если же по ординате откладывают суммарное количество обнаруженных к данному моменту компонентов, то получают имеющую ступенчатую форму интегральную кривую.

В современной колоночной хроматографии вытекающий из колонки раствор (элюат) пропускают через соответствующий детектор, а затем с помощью автоматического коллектора или вручную собирают в виде отдельных фракций. Результаты обнаружения веществ в элюате представляют в виде хроматограммы (рис. 1.2, б).

Ширина хроматографических зон или соответственно полуширина пика на хроматограмме и отвечающий ему объем элюата — иными словами, разрешающая способность колонки — зависят от многих факторов. Некоторые из них, известные под собирательным термином «диффузия», способствуют размыванию и перекрыванию хроматографических зон. Чтобы уменьшить влияние диффузии и тем самым повысить разрешающую способность колонки, используют мелкозернистые однородные сорбенты. Однако, поскольку гидродинамическое сопротивление

мелких частиц сорбента потока жидкости довольно высоко, элюент необходимо подавать на колонку под давлением. Поэтому такой метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) известен также под названием «жидкостная хроматография высокого давления» [6—13].

Частицы сорбента могут быть мелкопористыми и неоднородными по форме и размерам (например, силикагель [14]) или представлять собой сферические ядра (шарики), покрытые сорбционным слоем, полученным путем адсорбции либо, что более предпочтительно, с помощью соответствующей химической реакции (химически связанные фазы [15]). Колонки, наполненные такими сферическими частицами с поверхностнопористым слоем, обладают большей эффективностью, но меньшей емкостью по сравнению с колонками, содержащими объемнопористые частицы. Иногда улучшения разделяющей способности колонки достигают путем программируемого изменения давления или скорости потока растворителя. Для обнаружения и количественного определения веществ в элюате служат различные детекторы [16]. Из числа детекторов, применяемых в ВЭЖХ, наиболее универсальны дифференциальные рефрактометры (позволяющие измерять разность коэффициентов преломления элюента и элюата) и проточные детекторы, обычно используемые в газовой хроматографии. Применение УФ- и ИК-спектрофотометров ограничено теми случаями, когда молекулы анализируемых веществ содержат хромофорные группы, область поглощения которых не перекрывается с областью поглощения элюента.

В хроматографии (и до некоторой степени и в электрофорезе) образец часто подвергают некой химической обработке с целью получить более простую смесь веществ, увеличить ее растворимость, изменить летучесть компонентов, улучшить их разделение или увеличить чувствительность определения. Последнее достигается, например, путем превращения веществ в флуоресцирующие производные [17]. Выбор метода такой обработки определяется следующими требованиями: реакция должна быть количественной, не давать побочных продуктов и не требовать чрезмерного избытка реагентов. В некоторых автоматических анализаторах предусмотрена химическая модификация соединений, выходящих из колонки, т. е. элюат подвергается определенной химической обработке, в результате которой образуются окрашенные или флуоресцирующие производные анализируемых веществ.

Известен такой вариант колоночной хроматографии, в котором элюент перемещается по колонке под действием центробежной силы [18], а не давления. В этом случае колонка представляет собой своего рода зональный ротор центрифуги, вдоль

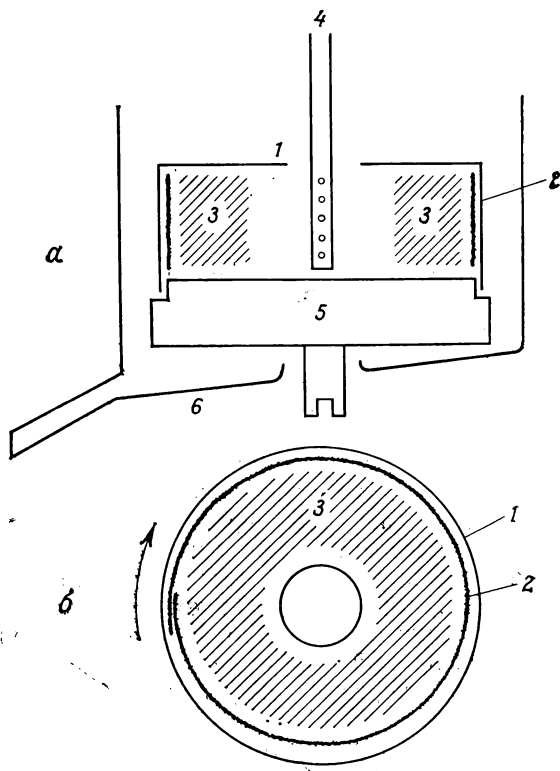


Рис. 1.3. Прибор для радиальной колоночной хроматографии (хроматоцентрифуга) [18] (с разрешения авторов).

а — продольное сечение; *б* — вид сверху; 1 — сетчатый кожух колонки; 2 — фильтр; 3 — сорбент; 4 — трубка с отверстиями для подачи элюента; 5 — ро-
тор, на котором крепится колонка; 6 — поддон с отводом для сбора элюата.

оси которого расположена трубка с отверстиями для ввода образца и подачи растворителей (рис. 1.3). При вращении центрифуги происходит элюирование веществ в направлении от центра к периферии колонки. Разделяемые вещества образуют цилиндрические зоны, диаметр которых возрастает по мере поступления растворителя, и в конечном итоге достигают поверхности колонки. Элюат стекает в специальный поддон, и его далее можно собрать в виде отдельных фракций. Описанный способ разделения веществ не следует путать с используемым в приборе «Сентри-хром», рабочим элементом которого является набор коротких колонок, расположенных перпендикулярно оси вращения центрифуги.

Вытеснительная хроматография основана на применении в качестве элюента такого растворителя, сродство которого к сорбенту выше, чем у любого из компонентов разделяемой смеси. Такой элюент вытесняет все ранее сорбированные компоненты, которые в свою очередь вытесняют друг друга и в результате выходят из колонки в порядке увеличения их сродства к неподвижной фазе. Чтобы избежать перекрывания зон разделяемых веществ, в исходную смесь вводят дополнительные вытеснители, которые по своему сродству к сорбенту занимают промежуточное положение между каждым двумя наиболее близкими по этому параметру компонентами. Такой метод разделения получил название вытеснительной хроматографии с носителем.

Разделение методом проявительной хроматографии проводят либо в одной и той же системе растворителей (изократический режим), либо в системах с постепенно возрастающей элюирующей способностью. В последнем случае скорость разделения возрастает, а хроматографические зоны, имевшие вытянутый «хвост» или размытый фронт, становятся более симметричными. Изменение состава элюента может быть дискретным (ступенчатое элюирование) или постепенным (градиентное элюирование). Если за один прием не удастся полностью разделить какие-то компоненты, то это можно осуществить с помощью так называемой «рециклической» хроматографии, т. е. пропуская элюат через колонку повторно и таким образом увеличивая ее длину.

В распределительной хроматографии используют два частично смешивающихся растворителя. Обычно более полярный растворитель служит неподвижной фазой. В обращенно-фазовой распределительной хроматографии более полярной является подвижная фаза, причем если поверхность сорбента неполярна, то покрывать его слоем неполярного растворителя уже не нужно. Этим методом часто удается разделить такие сравнительно неполярные вещества, которые не поддаются разделению в условиях обычной распределительной хроматографии. В методе противоточного распределения проводится, как правило, поэтапное, а не непрерывное распределение веществ между двумя частично смешивающимися растворителями. Его современный вариант — капельная противоточная хроматография [19, 20] — представляет собой непрерывный процесс, отличающийся от распределительной хроматографии только тем, что неподвижная фаза не закреплена на твердом носителе.

В отличие от применяемых в распределительной хроматографии сорбентов, которые для обеспечения их наиболее эффективного контакта с неподвижной фазой необходимо очень плотно упаковать в колонке, ионообменники и гидрофильные

гели, способные существенно изменять свой объем, требуют неплотной упаковки. Ионообменники представляют собой полимеры губчатой структуры, содержащие ионогенные группы [21, 22]. Они обратимо связывают ионы противоположного знака и таким образом препятствуют элюированию последних. Еще сравнительно недавно роль ионообменников выполняли в основном природные или полусинтетические материалы, в настоящее же время широкое распространение, особенно в неограническом анализе, получили синтетические ионообменные смолы (иониты) [23]. Как и кислоты или основания, иониты делятся на сильные и слабые. Например, сульфополикислоты являются сильнокислотными катионитами, а смолы, содержащие карбоксильные группы, — слабокислотными; полимеры, представляющие собой многоатомные четвертичные аммониевые основания, относятся к числу сильноосновных анионитов, а полиамины — к слабоосновным. Среди обладающих ионообменными свойствами производных целлюлозы, используемых, в частности, при разделении белков (см. разд. 3.2.2), можно отметить карбоксиметил-, диэтиламиноэтил- и эпихлоргидринтриэтаноламиноцеллюлозу (соответственно CM-, DEAE- и ECTEOLA-целлюлозу).

В ионообменной хроматографии элюентами обычно служат буферные растворы, различающиеся величиной pH, ионной силой, а также способностью к образованию комплексов. Лигандообменная хроматография основана на образовании комплексов разделяемых веществ с коионами ионита (например, с ионами металлов, связанными с функциональными группами катионита). Компоненты анализируемой смеси элюируются с такого модифицированного ионита в порядке уменьшения констант нестойкости их комплексов. Путем обработки ионитов подходящими органическими соединениями ионной природы получают сорбенты с гидрофобной поверхностью, применяемые в так называемой ион-парной хроматографии, которую можно рассматривать как вариант обращенно-фазовой распределительной хроматографии. Добавление в подвижную водную фазу циклодекстринов, поверхностно-активных веществ и других мицеллообразующих соединений в принципе позволяет осуществлять хроматографическое разделение нерастворимых в воде веществ в присутствии водорастворимых («псевдофазная» ЖХ). Мыла и подобные им соединения можно также использовать для покрытия гидрофобной неподвижной фазы с целью придать ей ионообменные свойства («мыльная» хроматография). Ионной хроматографией* (см. 4.2, разд. 14.6) назван такой метод раз-

* Более подробно метод ионной хроматографии изложен в монографии: Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. — М.: Мир, 1984, с. 222. — *Прим. ред.*

деления путем ионного обмена, в котором перед измерением электропроводности элюат пропускают через еще одну ионообменную колонку с тем, чтобы удалить буфер. Это название уже само по себе весьма неопределенно, кроме того, так же называют методику одноионного детектирования, применяемую в хроматомасс-спектрометрии (см. разд. 1.4), что еще больше усиливает путаницу.

Новый метод разделения белков в соответствии со значениями их изоэлектрических точек (pI) называется хроматофокусированием. Белок наносят на колонку с ионообменником на основе агарозы и элюируют буферным раствором сложного состава (полибуфером), pH которого меньше pI белка. При этом в колонке автоматически формируется линейный градиент pH , и белок концентрируется в той области, где pH буфера равен pI белка, т. е. процесс аналогичен изоэлектрическому фокусированию (см. разд. 1.5). Компоненты смеси белков элюируются с колонки в порядке уменьшения их pI .

Хроматография высаливания является устаревшим методом выделения белков путем их осаждения на ионообменниках. Неионные соединения можно отделить от ионов с помощью методов запаздывания ионов или исключения ионов. В первом методе используются иониты, содержащие одновременно катионные и анионные группировки (так называемые структуры типа «змея в клетке»), а во втором — носители, адсорбирующие только неионные соединения.

В эксклюзионной хроматографии неподвижной фазой служат гелеобразные неионные полимеры, избирательно удерживающие такие молекулы, которые способны проникнуть в поры геля. Этот метод разделения веществ иногда называют гелефильтрацией или хроматографией на молекулярных сайтах. Такие термины абсолютно неприемлемы, поскольку создается впечатление, что носитель удерживает преимущественно большие молекулы. Термин «гельпроникающая хроматография» лучше отражает суть процесса, однако по некоторым причинам его используют только для обозначения хроматографии на гидрофобных полимерных сорбентах в системах органических растворителей. К счастью, все большее распространение получает название «гель-хроматография», которое не подчеркивает принцип разделения и поэтому имеет общий характер [24, 26].

Гидрофильные гели представляют собой сшитые (декстран) или линейные (агароза) полисахариды либо синтетические полимеры (например, полиакриламид) с известным размером пор, определяющим интервал фракционирования водорастворимых молекул. Гидрофобные гели, предназначенные для фракционирования липофильных соединений в органических растворителях, по своей природе являются полимерами углеводо-

родов (например, полистирол). Оба типа гелей пригодны не только для разделения, но и для оценки молекулярной массы компонентов полидисперсных смесей. Находят применение также неорганические гели — пористое стекло и пористый силикагель, которые в отличие от полисахаридов могут быть использованы в колонках для ВЭЖХ. Известны производные декстрана, обладающие одновременно гидрофильными и липофильными свойствами, т. е. способные набухать не только в воде, но и в органических растворителях. Для таких гелей характерно несколько механизмов сорбции растворенных веществ. В частности, определенный вклад вносят гидрофобные взаимодействия. Молекулы геля могут также содержать ионогенные группы: сильнокислую сульфопропильную (SP), слабокислую карбоксиметильную (CM), сильноосновную диэтил-(2-оксипропил)аминоэтильную (QAE) или слабоосновную диетиламиноэтильную (DEAE).

Аффинная хроматография [27—31] представляет собой один из наиболее специфических методов выделения реакционноспособных соединений, в частности ферментов, и даже таких надмолекулярных агрегатов, как вирусы. Сорбентом в этом случае служит гель типа агарозы, к которому ковалентно присоединен подходящий лиганд, например субстрат фермента. Когда раствор, содержащий выделяемое вещество (скажем, фермент), пропускают через колонку с соответствующим образом приготовленным сорбентом, взаимодействие этого вещества с закрепленным на сорбенте лигандом (в данном случае фермента с субстратом) приводит к его удерживанию и, следовательно, к концентрированию. Поскольку сорбция носит обратимый характер, это вещество можно затем элюировать с колонки. Один из вариантов этого приема, который, строго говоря, уже не относится к области хроматографии, заключается в том, что иммобилизованный на геле фермент служит для непрерывного превращения растворенного в подвижной фазе субстрата. Разделение по методу аффинной хроматографии может быть основано на различного рода специфических взаимодействиях, таких, как связывание фермента с ингибитором, гормона с рецептором, антигена с антителом, а также гибридизация полинуклеотидов. Этот метод позволяет выделять даже целые клетки.

1.3. Плоскостная хроматография

В плоскостной хроматографии миграционной средой для разделяемых веществ служит сорбент, имеющий форму листа или пленки [32—36]. Для обозначения этого метода следует избегать термина «плоскостная хроматография», поскольку он не отражает в должной мере того обстоятельства, что в

большинстве случаев слой сорбента представляет собой плоскость, т. е. имеет два измерения. В свое время широкое применение получила хроматография на фильтровальной бумаге (бумажная хроматография), однако впоследствии выяснилось, что, используя тонкоизмельченные сорбенты, можно получать более компактные зоны за меньшее время. В первоначальном варианте, называемом хроматографией в незакрепленном слое, порошок сорбента просто наносили на почти горизонтальную поверхность стеклянной пластинки. В настоящее время оба этих метода в значительной степени уступили свои позиции тонкослойной хроматографии (ТСХ), которая отличается тем, что слой сорбента (чаще всего силикагеля с размером частиц 250 мкм) прочно связан (обычно с помощью гипса) с подложкой из стекла, пластмассы или алюминиевой фольги. Применяются также пластинки, полученные путем спекания сорбента на поверхности стекла [37]. Преимущество таких пластинок заключается в том, что после соответствующей регенерации их можно использовать повторно. Пластины на основе стекловолна имеют торговую марку «Instant Thin-Layer Chromatography» (ITLC). Сорбенты для тонкослойной гель-хроматографии наносят на подложку, не добавляя к ним связующего, поэтому угол наклона таких пластинок к горизонтальной поверхности должен быть не больше, чем это необходимо для нисходящего элюирования. Пластины с закрепленным слоем обычно располагают вертикально, и подвижная фаза поднимается по слою сорбента под действием капиллярных сил.

В тех случаях, когда хроматографическим материалом являются полисахариды (бумага, декстрановый гель и т. п.), роль неподвижной фазы в действительности выполняет вода, т. е. реализуется принцип распределительной хроматографии. Иногда в ТСХ используют материалы, сорбционные свойства которых определенным образом меняются в направлении от одного края пластинки к другому (градиентные слои). Это касается также бумажной хроматографии (например, можно создать градиент рН).

Если разделение проводится в аналитических целях, образцы наносят в виде пятен (стартовые пятна), расположенных на некотором расстоянии от одного края прямоугольного листа или пластинки; если же разделение проводится в препаративных целях, образцы наносят вдоль стартовой линии в виде полосок, параллельных краю листа. В последнем случае для нанесения образца часто используют специальные приспособления (например, автоматический аппликатор). Наносить вещество на тонкослойную пластинку можно также путем конденсации фракций, получаемых при газохроматографическом разделении, или из нагретого патрона с образцом (термофрактогра-

фия). Хроматограммы элюируют и закрытых сосудах (камерах). Лист бумаги или пластинку помещают в камеру таким образом, чтобы тот край, вблизи от которого нанесено вещество, был погружен в растворитель. При движении элюента образуется граница между смоченной и несмоченной поверхностью сорбента (фронт растворителя), которая перемещается параллельно стартовой линии и в конечном итоге достигает противоположной стороны хроматограммы. Лист фильтровальной бумаги может иметь форму цилиндра или кольца, а слой порошкообразного сорбента может быть нанесен на поверхность палочки (хромарод, хроматобар) или на внутреннюю поверхность трубки. Для плоскостной хроматографии используются даже волокнистые сорбенты (например, шелк).

Одно из преимуществ плоскостной хроматографии состоит в том, что хроматографировать можно одновременно несколько образцов, что экономит время и позволяет в рамках одного эксперимента сравнивать свойства различных препаратов. Разрешающую способность можно увеличить, обеспечив непрерывное движение растворителя в слое сорбента (проточное элюирование) или повторяя хроматографирование несколько раз (программированное многократное элюирование). Образец, нанесенный вблизи одного из углов квадратной пластинки, можно последовательно элюировать в двух взаимно перпендикулярных направлениях (двумерная хроматография).

В круговой хроматографии элюирование осуществляется в направлении от центра к периферии слоя сорбента. Образец наносят в виде дуги или кольца вокруг центра хроматограммы, куда затем подают растворитель. Полученные с помощью этого метода хроматографические зоны представляют собой концентрические дуги или окружности, расположенные на различном удалении от центрального пятна. Если хроматографирование в плоском слое сорбента осуществляется таким же образом, как в классической колоночной хроматографии, метод непрерывного элюирования соответствует простому элюированию с колонки, многократное элюирование — хроматографии с повторяющимся циклом, а радиальное элюирование — центрифужной колоночной хроматографии. Следует отметить, что под действием центробежной силы скорость радиального элюирования плоских хроматограмм увеличивается; для создания такой силы используют приспособление типа фонографа.

С уменьшением свободного пространства над слоем сорбента возрастает скорость элюирования, а картина разделения становится более четкой и воспроизводимой. Это достигается в хроматографических камерах специальной конструкции (например, в камерах типа «сэндвич» или камерах Бреннера — Нидервизера). Высокоэффективная ТСХ [38] обеспечивает высокую

скорость, чувствительность и воспроизводимость анализа при условии строгого соблюдения постоянства скорости элюирования и состава неподвижной и газовой фазы. Известен также метод ТСХ с программированным изменением состава паров подвижной фазы вдоль поверхности слоя сорбента.

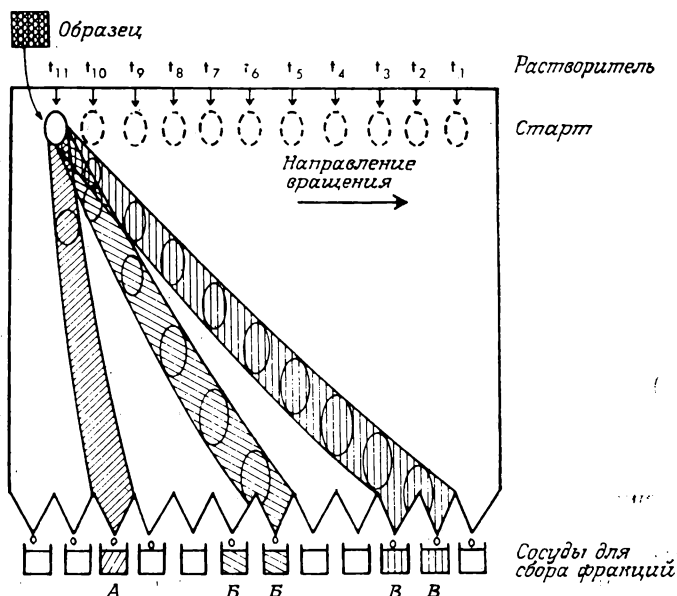


Рис. 1.4. Разделение компонентов смеси в непрерывном потоке раствора образца.

Образец непрерывно подается на медленно вращающийся лист бумаги цилиндрической формы, орошаемый нисходящим потоком элюента. Индивидуальные компоненты смеси (А, В и В) образуют при этом полосы. Если бы образец хроматографировали на неподвижном листе бумаги, то в моменты времени t_1 — t_{11} зоны занимали бы положения, обозначенные эллипсами внутри заштрихованных полос. Стекающий с бумаги элюат попадает в специальные стационарные сосуды для сбора фракций.

Для обнаружения бесцветных веществ на бумажных или тонкослойных хроматограммах используют методы неразрушающего контроля (например, УФ-облучение или выдерживание в атмосфере, насыщенной парами иода), а также обработку (в частности, опрыскивание) хроматограмм более или менее специфическими обнаруживающими реагентами. До или после обнаружения зон присутствующие в них вещества можно соответствующим образом элюировать и далее использовать, например, для количественного анализа.

Поглощающие свет или флуоресцирующие зоны можно обнаруживать при помощи автоматического сканирующего денси-

тометра [34], который позволяет представить результаты анализа в виде соответствующей кривой (см., например, рис. 1.2, б). Аналогичным образом можно обработать хроматограммы, содержащие радиоактивные зоны. Радиоактивные вещества обнаруживают также, используя метод радиоавтографии, суть которого заключается в том, что на фотографической пленке, прижатой эмульсионным слоем к поверхности хроматограммы, экспонируются участки, соответствующие радиоактивным зонам. После обработки такой пленки получают точную копию хроматограммы, на которой радиоактивные зоны представлены темными пятнами. Для обнаружения биологически активных веществ, например антибиотиков, используют чувствительные к этим веществам микроорганизмы (биоавтография). Если хроматограммы имеют цилиндрическую форму (слой сорбента нанесен на поверхность палочки или на внутреннюю поверхность трубки), их можно пропустить через круговую печь и обнаружить испаряющиеся вещества, используя детекторы, применяемые в газовой хроматографии.

Методом жидкостной хроматографии за один прием обычно разделяют лишь ограниченное количество образца. Если же сорбентом служит медленно вращающийся цилиндр из хроматографической бумаги, разделение можно проводить в непрерывном режиме [40] (см. рис. 1.4). Из неподвижного аппликатора, расположенного вблизи верхней кромки цилиндра, раствор анализируемого образца непрерывно подают на бумагу, орошаемую нисходящим потоком элюента. Стекающий по бумаге растворитель, достигнув ее нижнего края, скапывает в неподвижные сосуды. Выбор подходящей скорости вращения цилиндра относительно коллектора обеспечивает четкое фракционирование смеси веществ. Представленное на рис. 1.4 разделение компонентов смеси на несколько «потоков» является результатом сложения двух сил, одна из которых стремится переместить вещество в горизонтальном направлении (обусловлена вращением бумаги), а другая — в вертикальном (нисходящий поток растворителя).

1.4. Газовая хроматография

Для хроматографического разделения летучих соединений в качестве неподвижной фазы используется инертный газ-носитель (как правило, азот или гелий), который последовательно проходит через устройство для ввода образца, термостатируемую длинную и тонкую колонку с сорбентом и, наконец, через детектор [41—44]. Регистрируемая самописцем кривая изменения сигнала детектора называется хроматограммой. Она состоит из набора пиков (рис. 1.2), по положению которых отно-

сительно момента ввода образца (т.е. по времени удерживания вещества) можно идентифицировать компоненты смеси, а по их площади — оценить количества этих компонентов.

Многие вещества, разлагающиеся при высоких температурах, можно хроматографировать в виде их устойчивых летучих производных. Соответствующая обработка образца может быть проведена до его введения в хроматограф или после его введения в специальное устройство (нагреватель, реакционную камеру, пиролизатор и т. п.), являющееся составной частью хроматографа. Образцы вводят в поток газа-носителя либо непосредственно путем впрыскивания из шприца через отверстие, закрытое резиновой прокладкой, либо с помощью специальной петли, которую предварительно заполняют образцом, а затем подключают к системе. В капиллярной газовой хроматографии (см. ниже) используют специальные дозаторы, позволяющие уменьшить количество поступающего на колонку вещества.

В газо-жидкостной хроматографии носителями неподвижной фазы служат диатомовые земли и другие тонкоизмельченные тугоплавкие материалы, которые часто «деактивируют», т. е. промывают кислотой или щелочью либо силианизируют, чтобы исключить возможность адсорбции на их поверхности разделяемых веществ. Носитель покрывают слоем неподвижной фазы, представляющей собой высококипящую жидкость (обычно синтетический полимер), и приготовленным таким образом сорбентом заполняют стеклянные или металлические трубки (насадочные колонки), которые в зависимости от их длины и размеров термостата могут быть изогнуты или иметь форму спирали.

Рабочую температуру колонки можно поддерживать постоянной (изотермический режим) или постепенно увеличивать (программирование температуры), чтобы сократить время выхода малоподвижных веществ. Эти режимы разделения аналогичны применяемым в жидкостной хроматографии изократическому и градиентному элюированию. Критерием пригодности сорбента для решения конкретной задачи является отсутствие «фона» при рабочей температуре колонки, которая может достигать 400 °С, т. е. достаточная термостабильность колонки. В газо-твердофазной хроматографии разделение часто проводят при низких температурах, в качестве сорбентов в этом методе используются природные, синтетические и полусинтетические материалы.

Замена обычных насадочных колонок на полые («открытые») капиллярные трубки, внутренние стенки которых покрыты слоем сорбента (открытые капиллярные колонки), приводит к значительному увеличению эффективности разделения. Неподвижную жидкую фазу либо непосредственно наносят на внут-

ренную поверхность металлических или стеклянных капилляров, либо эту поверхность предварительно модифицируют таким образом, чтобы образовался слой пористого носителя. В первом случае получают так называемые открытые капиллярные колонки с непористым слоем (ОНС-колонки), а во втором — открытые капиллярные колонки с пористым слоем (ОПС-колонки). Колонки второго типа имеют большую емкость, но меньшую эффективность по сравнению с соответствующими колонками первого типа. Насадочные капиллярные колонки также могут обладать высокой эффективностью, однако газ на них необходимо подавать под большим давлением.

Интегральные детекторы типа эвдиометра Джанка, принцип работы которых заключается в измерении объема выходящего из колонки газа, к настоящему времени вышли из употребления, а наиболее широкое распространение получили универсальные детекторы — пламенно-ионизационный и детектор по теплопроводности (катарометр). Кроме того, существуют селективные детекторы. Например, детектор по захвату электронов используется для обнаружения соединений, в состав которых входят атомы (в частности, атомы галогенов), сродство которых к электрону выше, чем у ионизованного газа-носителя, а термоионный детектор применяется для обнаружения фосфорорганических соединений.

Наиболее эффективное сочетание возможностей техники разделения и идентификации веществ достигнуто путем объединения в одну систему газового хроматографа и масс-спектрометра. Такая система называется хроматомасс-спектрометром, а соответствующий метод анализа — хроматомасс-спектрометрией. Масс-спектрометр способен работать в режиме обнаружения какого-то одного иона или одновременно нескольких ионов, в частности фрагментов молекул. С помощью компьютера можно построить кривую элюирования этих ионов, а также определить состав анализируемого образца и оценить количество каждого компонента, даже если они не полностью разделились.

1.5. Электрофорез

Метод разделения, основанный на миграции заряженных частиц из узкой зоны в стабилизированном электролите, был назван *зонным* электрофорезом, чтобы его можно было отличить от более старого метода — миграции из широкой зоны в «свободном» растворе электролита, т. е. электрофореза с подвижной границей (см. рис. 1.1). Предлагались такие названия этого метода, как «ионофорез», «ионография», «катафорез», «элект-

рохроматография» и т. п., однако, поскольку ни одно из этих названий не стало общепринятым, а старый метод больше не используется, в дальнейшем мы будем называть электрофорезом всю совокупность современных электромиграционных методов [33, 34, 45—49].

Электролит можно стабилизировать в вертикальной колонке путем создания градиента его плотности в направлении от верхнего конца колонки к нижнему, однако обычно неподвижность электролита обеспечивается в результате его абсорбции различными природными или синтетическими полимерами. В соответствии с природой носителя различают методы электрофореза на бумаге, мембранах из ацетилцеллюлозы, в гелях агара или крахмала, полиакриламидном геле и т. п. Электрофоретические методы можно также классифицировать по способу разделения или по типу применяемой аппаратуры (например, колоночный и тонкослойный электрофорез).

Электрофоретическому разделению веществ мешает их диффузия. Среда, в которой мигрируют молекулы, сама по себе в какой-то мере препятствует диффузии, однако еще в большей степени можно подавить этот эффект и одновременно увеличить подвижность сравнительно небольших молекул с помощью высокого напряжения (высоковольтный электрофорез). В некоторых случаях гели выполняют роль сит. Например, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия разделение предварительно денатурированных белков происходит в соответствии с размерами их молекул. При проведении электрофореза в градиентном геле разделяемые вещества мигрируют в направлении уменьшения диаметра пор геля, и поэтому с увеличением расстояния от старта задерживаются все более мелкие молекулы.

Для электрофореза можно использовать один буферный раствор определенного состава («непрерывный» буфер) либо систему из двух буферных растворов («ступенчатый» буфер). В последнем случае собственно разделению образца на компоненты предшествует стадия его концентрирования в виде узкой стартовой зоны на границе раздела буферов (ступенчатый электрофорез). Если разделение проводится в трубках с полиакриламидным гелем, образующиеся зоны имеют форму дисков. В условиях изотахофореза [50] мигрирующие вещества образуют соприкасающиеся друг с другом зоны, которые расположены между лидирующим и замыкающим электролитом. Чтобы эти зоны не соприкасались, в исходную смесь добавляют вещества-«разделители» (spacers), которые по своей электрофоретической подвижности занимают промежуточное положение между двумя наиболее близкими по этому параметру компонентами смеси. Таким образом, изотахофорез в опре-

деленном смысле аналогичен вытеснительной хроматографии, а вещества-«разделители» по существу выполняют ту же роль, что и дополнительные вытеснители в методе вытеснительной хроматографии с носителем (см. разд. 1.2). Электрофокусирование (изоэлектрическое фокусирование) проводят в градиенте pH, который формируется при пропускании электрического тока через стабилизированный буфер, содержащий смесь амфолитов. Мигрируя в такой среде, белки и другие амфотерные соединения в конечном итоге достигают такой области, где pH равен их изоэлектрической точке, и образуют очень узкие зоны [51].

Плоскостной электрофорез имеет те же преимущества, что и плоскостная хроматография, т. е. позволяет на одной электрофореграмме сравнивать одновременно несколько образцов. Методом электрофореза можно, как и в двумерной бумажной или тонкослойной хроматографии, разделять вещества в двух направлениях, в частности в буферах с различным значением pH. Возможен и другой вариант, когда для разделения в двух взаимно перпендикулярных направлениях используют различные носители. Например, сначала проводят электрофорез в узкой полоске агарозного геля, в котором подвижность молекул определяется их зарядом, а затем — в пластинке агарозного геля, в котором вещества разделяются в соответствии с размерами их молекул. Способы качественного и количественного анализа электрофореграмм сходны с используемыми в бумажной и тонкослойной хроматографии. Белки можно обнаруживать также с помощью моноспецифических антител (иммунофиксация).

В методе иммуноэлектрофореза для определения положения индивидуальных белков на электрофореграмме применяют реакцию преципитации с антисывороткой, помещенной вдоль направления миграции. Более эффективного разделения компонентов можно добиться с помощью метода перекрестного иммуноэлектрофореза, суть которого сводится к следующему. Узкую полоску геля с разделенными в одном направлении антигенами переносят на пластинку с гелем, содержащим антитела, и проводят дополнительный электрофорез в перпендикулярном направлении. Образующиеся при этом зоны преципитации имеют форму ракет, высоту которых можно использовать для оценки количества антигена (методы электроиммунотестирования и «ракетного» электрофореза).

Высокой разрешающей способностью обладает также комбинированный метод двумерного разделения веществ, представляющий собой сочетание бумажной хроматографии в одном направлении и электрофореза на бумаге — в другом. Для сравнительного разделения веществ можно использовать непре-

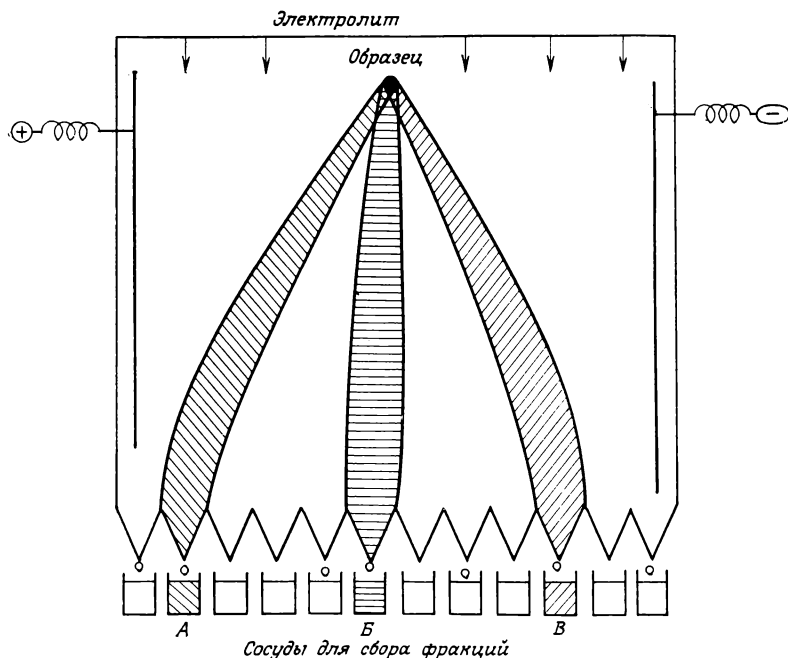


Рис. 1.5. Непрерывный электрофорез.

Образец непрерывно подается в одну точку, расположенную вблизи верхнего края фильтровальной бумаги. Под действием электрического поля происходит разделение образца на компоненты (А, Б и В) в горизонтальном направлении, а нисходящий поток электролита перемещает их в вертикальном направлении. Компоненты смеси образуют полосы, которые в конечном итоге достигают сосудов для сбора фракций.

рывный электрофорез на бумаге или в пластинке с гелем. Принцип этого метода, называемого также электрофорезом в свободном потоке, ясен из рис. 1.5.

1.6. Выводы

Хроматография, по-видимому, является наиболее универсальным методом разделения веществ. Она применима для разделения смесей любых растворимых или летучих соединений. Выбор того или иного метода хроматографии зависит от природы и количества образца, цели разделения, от опытности экспериментатора, а также от того, каким оборудованием он располагает и как скоро необходимо провести разделение.

Единственным хроматографическим методом разделения плохо растворяющихся газов является газовая хроматография, причем ее газо-твердофазный вариант часто предпочтительнее

ГЖХ (см. гл. 15). Другие газообразные вещества, такие, как углеводороды, лучше всего разделить при помощи ГЖХ. Метод газовой хроматографии применим и для разделения нелетучих соединений, если их можно превратить в стабильные летучие производные. Несмотря на то что существуют приборы, позволяющие разделять большие количества веществ, газовая хроматография не относится к числу совершенных препаративных методов. Основными достоинствами этого метода являются сравнительно высокая скорость анализа и возможность автоматизировать процесс, а главный недостаток — высокая стоимость оборудования. В силу последнего обстоятельства финансирование этой области исследований осуществляют в основном нефтеперерабатывающие фирмы, которые могут позволить себе нести большие расходы.

Теоретически любые растворимые вещества можно разделить с помощью подходящего метода жидкостной хроматографии. Ионообменная хроматография и электрофорез применимы в тех случаях, когда соединения имеют ионный характер или содержат ионогенные группы. Область применения гель-хроматографии ограничена соединениями с относительно высокой молекулярной массой (10^3 — 10^6 дальтон). Адсорбционная и разделительная хроматография используются для разделения веществ со средней молекулярной массой (10^2 — 10^4 дальтон), и поэтому эти методы представляют особый интерес для химиков-органиков. Небольшие количества веществ можно разделить с помощью различных методов плоскостной хроматографии. Преимуществом последних является возможность анализа одновременно нескольких образцов, а также низкая стоимость оборудования. Методы плоскостной хроматографии отличаются очень простым аппаратным оформлением, однако требуют от экспериментатора определенных навыков. Разработано несколько вариантов препаративной плоскостной хроматографии и количественного анализа хроматограмм, однако они в известной степени несовершенны. Современная колоночная хроматография обладает теми же достоинствами и недостатками, что и газовая хроматография, однако в отличие от последней ее можно рекомендовать не только для анализа, но и для препаративного выделения веществ, особенно если эти вещества недостаточно термостойки, разлагаются на свету или легко окисляются.

Подвижность органических молекул в хроматографической системе, несомненно, зависит от их структуры и связана с процессами сорбции и десорбции. В отдельных случаях можно установить связь между структурой и подвижностью молекул, что облегчает идентификацию соединений. Однако сами по себе хроматографические данные не дают никаких оснований

для сколько-нибудь надежных выводов о структуре соединений. Сделать такие выводы позволяют результаты прямого сравнения хроматографических свойств анализируемого вещества и подходящего стандарта. Однако, даже если соединения имеют одинаковую хроматографическую подвижность, утверждать, что они идентичны, по меньшей мере рискованно. Это отнюдь не означает, что хроматографические и электрофоретические методы малоинформативны. Они позволяют достаточно просто и быстро охарактеризовать исследуемые соединения, например определить степень полимеризации с помощью гелехроматографии или установить изоэлектрическую точку с помощью метода изоэлектрического фокусирования.

В качестве вводного курса хроматографии для начинающих можно рекомендовать ряд учебников, опубликованных в последнее десятилетие [52—55]. Статьи обзорного характера, предназначенные для тех, кто уже знаком с методом хроматографии, периодически печатаются в различных книгах [56—58] и журналах [59, 60]. Особую ценность для исследователей представляют библиография журналов «Analytical Chemistry» [59] и «Journal of Chromatography» [60], а также реферативные журналы. Методам хроматографии и электрофореза целиком посвящены несколько сборников с материалами симпозиумов [61, 62] и специализированные журналы [60, 63—68].

Обзоры по отдельным разделам хроматографии публикуются достаточно часто, тем не менее существует ряд вопросов, дополнительное освещение которых было бы весьма полезно. Некоторые из этих вопросов, заслуживающих, на наш взгляд, особого внимания, сформулированы ниже.

Систематический органический и неорганический анализы. Недалеко то время, когда аналитические схемы идентификации ионов и молекул, которые использовались и продолжают использоваться для обучения студентов, уступят место рациональному применению в педагогической практике таких хроматографических методик, как ТСХ.

Номенклатура. Необходим критический анализ применяемых в хроматографии терминов. Возможно, это позволит достичь хотя бы некоторой унификации [5, 69].

История совершенствования хроматографического оборудования. Интересно проследить, как совершенствовалась хроматографическая аппаратура. Как, начав с приспособлений, предназначенных совершенно для других целей (например, с гребенок и сушилок для волос, которые вошли в обиход в бумажной хроматографии), хроматографисты создали такое сложное оборудование, как полностью автоматизированная система ТСХ (Chromatаре) и система обработки данных хроматомасс-спектрометрии.

Применение хроматографии в различных областях, таких, как клиническая химия, судебная экспертиза и дистанционный анализ (например, слежение за процессами, связанными с использованием радиоактивных препаратов, или определение состава взеземных объектов).

Перспективы развития различных типов хроматографии. Несмотря на то что в создании более специфичных сорбентов (по сравнению с предложенными в свое время Полингом [70]) достигнуты значительные успехи, по-видимому, аффинная хроматография будет продолжать развиваться. Быстрыми темпами будет, по-видимому, совершенствоваться и *препаративная хроматография* (например, центрифужная [18], противоточная [19, 20] и так называемая «флип-флопная» хроматография* [71]). Широкомасштабное использование хроматографии (например, для утилизации следовых количеств примесей или очистки лекарственных препаратов) потребует разработки новых, более рациональных процессов непрерывного разделения. Отчетливо наблюдается тенденция к полной автоматизации качественного и количественного анализа элюатов (использование микропроцессоров). Уже предпринято несколько попыток сконструировать универсальный детектор для жидкостной хроматографии.

Возможности газовой хроматографии могут быть значительно расширены в результате введения в практику исследований сверхкритической (флюидной) газовой хроматографии [72] и других методов, обеспечивающих селективность подвижной фазы. Многообещающим методом разделения веществ с очень большой молекулярной массой является фракционирование в поле потока. Этот процесс родствен хроматографии, в которой для селективного удерживания веществ используется внешнее поле** [73]. Естественно, нельзя исключить, что хроматография и(или) электрофорез будут в конце концов вытеснены каким-то новым методом разделения, однако это вряд ли произойдет в обозримом будущем.

* Суть метода сводится к тому, что колонку с сорбентом, на который нанесена анализируемая смесь веществ, попеременно промывают то полярным, то неполярным растворителем (например, в последовательности: вода, гептан, метанол, хлористый метилен), т. е. последовательно экстрагируют вещества различной полярности, причем при замене растворителя меняют направление потока и колонку, на которой происходит последующее более полное разделение экстрагированных веществ. — *Прим. перев.*

** Автором одного из первых вариантов такого метода хроматографии является В. П. Чишков (Авт. свид. СССР 231204, Бюлл. изобр. № 35, 1969), который предложил осуществить хроматографическое разделение изотопов в гравитационном поле центрифуги. — *Прим. ред.*

Литература

1. *Strain H. H.* — In: *Chromatography*./Ed. Heftman E. New York: Reinhold, 1961, p. 11.
2. *Strain H. H.* — In: *Chromatography*./Ed. Heftman E. 2nd Edn., New York: Reinhold, 1967, p. 11.
3. *Strain H. H., Svec W. A.* — In: *Chromatography*./Ed. Heftman E. 3rd Edn., New York: Van Nostrand — Reinhold, 1975, p. 14.
4. *Hagdahl L.* — In: *Chromatography*./Ed. Heftman E. New York: Reinhold, 1961, p. 56.
5. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations on Nomenclature for Chromatography. IUPAC Secretariat, Oxford, 1972.
6. Современное состояние жидкостной хроматографии. Пер. с англ./Под ред. Дж. Киркланда. — М.: Мир, 1974.
7. *Brown P. R.* High Pressure Liquid Chromatography. Biochemical and Biomedical Applications. New York: Academic Press, 1973.
8. Жидкостная колоночная хроматография. В 3-х томах. Пер. с англ./Под ред. К. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.
9. *Parris N. A.* Instrumental Liquid Chromatography. A Practical Manual on High-Performance Liquid Chromatographic Methods. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 5. Amsterdam: Elsevier, 1976.
10. *Scott R. P. W.* Contemporary Liquid Chromatography. New York: Wiley, 1976.
11. *Huber J. F. K.* Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 13. Amsterdam: Elsevier, 1978.
12. *Snyder L. R., Kirkland J. J.* Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd Edn. New York: Wiley, 1979.
13. *Энгельгард Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях. Пер. с англ. — М.: Мир, 1980.
14. *Unger K. K.* Porous Silica. Its Properties and Use as a Support in Column Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 16. Amsterdam: Elsevier, 1979.
15. *Grushka E.* (Editor). Bonded Stationary Phases in Chromatography. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1974.
16. *Scott R. P. W.* Liquid Chromatography Detectors. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 11. Amsterdam: Elsevier, 1977.
17. *Lawrence J. F., Frei R. W.* Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 7. Amsterdam: Elsevier, 1976.
18. *Heftmann E., Krochta J. M., Farkas D. F., Schwimmer S. J.* Chromatogr., 66, 365 (1972).
19. *Ito Y., Bowman R. L.* J. Chromatogr., 147, 221 (1978).
20. *Hostettman K.* Planta Med., 39, 1 (1980).
21. *Dorfner K.* Ion Exchangers. Properties and Applications. 3rd Edn., Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1972.
22. *Walton H. F.* Ion-Exchange Chromatography. Stroudsburg, PA: Halsted, 1976.
23. *Michal J.* Inorganic Chromatographic Analysis. New York: Van Nostrand — Reinhold, 1974.
24. *Determann H.* Gel Chromatography, Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves. 2nd Edn., New York: Springer, 1969.
25. *Fischeer L.* An introduction to Gel Chromatography. Amsterdam: North-Holland, 1980.
26. *Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D.* Modern Size-Exclusion Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography. New York: Wiley, 1979.
27. *Dunlap R. B.* (Editor). Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography. New York: Plenum, 1974.

28. *Jakoby W. B., Wilchek M.* (Editors). Affinity Techniques. Methods in Enzymology, Vol. 34. New York: Academic Press, 1974.
29. *Lowe C. R., Dean P. D. G.* Affinity Chromatography. New York: Wiley, 1974.
30. *Туркова Я.* Аффинная хроматография. Пер. с англ. — М.: Мир, 1980.
31. *Lowe C. R.* An Introduction to Affinity Chromatography. Amsterdam: North-Holland, 1979.
32. *Niederwieser A., Pataki G.* (Editors). Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1970—1972.
33. *Sherma J., Zweig G., Bevenue A.* Paper Chromatography and Electrophoresis. New York: Academic Press, 1971.
34. *Smith I., Feinberg J. G.* Paper and Thin-Layer Chromatography and Electrophoresis. 2nd Edn., London: Lorgmans, 1972.
35. *Gasparič J., Churáček J.* Laboratory Handbook of Thin-Layer Chromatography. Chichester: Horwood, 1978.
36. *Kirchner J. W.* Thin-Layer Chromatography. 2nd Edn., New York: Wiley, 1978.
37. *Okumura T. J.* Chromatogr., **184**, 37 (1980).
38. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Пер. с англ./Под ред. А. Златкиса, Р. Кайзера. — М.: Мир, 1979.
39. *Touchstone J. C., Sherma J.* (Editors). Densitometry in Thin-Layer Chromatography. New York: Wiley, 1979.
40. *Solms J.* Helv. Chim. Acta, **38**, 1127 (1955).
41. *Ambrose D.* Gas Chromatography. 2nd Edn., London: Butterworths, 1971.
42. *Jeffery P. G., Kipping P. J.* Gas Analysis by Gas Chromatography. 2nd Edn., Oxford: Pergamon, 1972.
43. *Purnell H.* New Development in Gas Chromatography. Advances in Analytical Chemistry, Vol. 11. New York: Wiley, 1973.
44. *Sevčík J.* Detectors in Gas Chromatography. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 4. Amsterdam: Elsevier, 1976.
45. *Nerenberg S. T.* Electrophoresis. A Practical Laboratory Manual. 2nd Edn., Oxford: Blackwell, 1972.
46. *Sargent J. R., Georg S. G.* Methods in Zone Electrophoresis. 3rd Edn., Poole: BDH Chemicals, 1975.
47. *Righetti P. G., Oss C. J. van, Vanderhoff J. W.* (Editors). Electrokinetic Separation Methods. Amsterdam: Elsevier, 1979.
48. *Deyl Z., Everaerts F. M., Prusik Z., Svendsen P. J.* (Editors). Electrophoresis. A Survey of Techniques and Applications. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 18. Amsterdam: Elsevier, 1979.
49. *Gaal O., Verczkey L.* Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules. New York: Wiley, 1980.
50. *Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M.* Isotachopheresis. Theory, Instrumentation and Applications. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 6. Amsterdam: Elsevier, 1976.
51. *Catsimpoolas N., Drysdale J.* (Editors). Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing. New York: Plenum, 1977.
52. *Zweig G., Sherma J.* (Editors). Handbook of Chromatography. Cleveland, OH: Chem. Rubber Co., 1972.
53. *Stock R., Rice C. B. F.* Chromatographic Methods. 3rd Edn., New York: Halsted, 1974.
54. *Heftmann E.* (Editor). Chromatography. A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods. 3rd Edn., New York: Van Nostrand — Reinhold, 1975.
55. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. В 2-х частях. Пер. с англ./Под ред. О. Микеша. — М.: Мир, 1982.

56. *Lederer M.* (Editor). *Chromatographic Reviews*. Amsterdam: Elsevier, since 1959.
57. *Giddings J. C., Keller R. A.* (Editors). *Advances in Chromatography*. New York: Dekker, since 1965.
58. *Cazes J.* (Editor). *Chromatographic Science*. New York: Dekker, since 1965.
59. *Analytical Chemistry*. Washington, DC: American Chemical Society, since 1950.
60. *Journal of Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, since 1958.
61. *Frigerio A., Renoz L.* (Editors). *Recent Developments in Chromatography and Electrophoresis*. Chromatogr. Symposia Series, Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, 1979.
62. *Catsimpoalas N.* (Editor). *Electrophoresis '78*, Proc. Inter. Conf. Amsterdam: Elsevier, 1978.
63. *Journal of Gas Chromatography*. Evanston, IL: Preston Tech. Abstr. Co., 1963—1968.
64. *Journal of Chromatographic Science*. Evanston, IL: Preston Tech. Abstr. Co., since 1968.
65. *Chromatographia*. Oxford: Vieweg, Braunschweig, and Pergamon, since 1968.
66. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatographic Communications*. Heidelberg: Hüthig, since 1978.
67. *Journal of Liquid Chromatography*. New York: Dekker, since 1978.
68. *Electrophoresis*. Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie International, since 1980.
69. *Ettre L. S. J. Chromatogr.*, **165**, 235 (1979).
70. *Dickey F. H. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **35**, 229 (1949).
71. *Nartin A. J. P., Halász I., Engelhardt H., Sewell P. J. Chromatogr.*, **186**, 15 (1979).
72. *Sie S. T., Beersum W. van, Rijnders G. W. A. Separ. Sci.*, **1**, 459 (1966).
73. *Giddings J. C. J. Chromatogr.*, **125**, 3 (1976).

Глава 2

Аминокислоты и олигопептиды

Томас Кастер, Алоис Нидервизер

2.1. Введение

Как следует из названия главы, в ней рассмотрены методы разделения аминокислот и олигопептидов, причем особое внимание уделено последним достижениям в этой области, а также сравнительно новым методикам. Методы, не претерпевшие существенных изменений со времени выхода в свет последнего издания этой книги [1], либо вообще не упомянуты (электрофорез и ТСХ), либо только дополнены (ионообменная хроматография). Применение рассматриваемых методов в клинической химии обсуждается в недавно опубликованной книге Бремера и др. [2].

2.2. Ионообменная хроматография

2.2.1. Аминокислоты и олигопептиды

Метод анализа аминокислот с помощью ионообменной хроматографии базируется на работах Штейна и Мура [3—5], которые систематически изучали проблемы, связанные с разделением и количественным определением наиболее распространенных аминокислот. В 1958 г. эти авторы [5] предложили автоматическую систему, позволяющую проводить полный анализ аминокислот за 24 ч. В дальнейшем эта система неоднократно модифицировалась с целью увеличения скорости и чувствительности анализа. В настоящее время предел обнаружения аминокислот составляет несколько пикомолей, а длительность анализа равна ~90 мин. Следует, однако, отметить, что ни одна из современных систем не дает такого высокого разрешения, как система, предложенная Муром и др. [5]. Уменьшение разрешающей способности, которое является следствием увеличения скорости разделения, затрудняет или даже делает невозможным определение малораспространенных аминокислот.

Со времени выхода третьего издания этой книги методы ионообменной хроматографии претерпели лишь незначительные

Таблица 2.1. Обзор некоторых опубликованных в последние годы работ по ионообменной хроматографии аминокислот и олигопептидов

Исследуемые соединения	Смолы	Буферные растворы	Обнаруживающий реагент и метод обнаружения	Примечания	Литература
Обычные аминокислоты	Катионит DC-4A	Различные	Фталевый альдегид, флуориметрический	—	6
Обычные аминокислоты	DC-4A, DX 8,25	Различные	Нингидрин	Элюенты, обеспечивающие лучшие характеристики базовой линии	7
Обычные аминокислоты	Аминекс А5	Пиридин-ацетатный	Гринитробензол-сульфокислота	—	8
Обычные аминокислоты	Катионит DC-4A	На основе солей лития	Нингидрин	Автоматический микроанализатор	9
Обычные аминокислоты	Катионит	Цитрат натрия	Нингидрин	Зависимость содержания свободных аминокислот в моче от возраста человека	10
Обычные аминокислоты	Двойная колонка	Различные	Нингидрин	Определение аминокислот в крови	11
Обычные аминокислоты	DC-6A, XX 907 ORCU	Цитратный	Нингидрин	Короткая программа для анализа физиологических жидкостей	12
γ-Аминомасляная кислота	НСВ Х8	Цитрат лития	Фталевый альдегид, флуориметрический	—	5, 13
β-Изоаминомасляная кислота, β-аланин	Катионит, двойная колонка	Цитрат натрия	Нингидрин	Анализ биологических образцов	15

Продолжение табл. 2.1

Исследуемые соединения	Смолы	Буферные растворы	Обнаруживающий реагент и метод обнаружения	Примечания	Литература
β-Изоаминомасляная кислота	Катионит	Цитратный	Нингидрин	—	16
Пролин, оксипролин	Катионит DC-4A	Цитратный	Фталевый альдегид, флуориметрия ^a	Предел обнаружения: 10 пмоль РгО, 20 пмоль Нур	17
3-Оксипролин	Дауэкс 50 M82	Цитрат натрия	Нингидрин	Анализ мочи	18, 19
N-Метилгистидин	Хромобелс А	Цитрат натрия	Нингидрин	Селективное определение	20
Тирозин, фенилаланин	Катионит, смитый на 7%	Различные	Нингидрин	Автоматическая система	21
Тирозин, 3,4-диокси-фенилаланин	Катионит	Цитратный	Нингидрин	—	22
L-Триптофан, серотонин, 5-оксииндолилуксусная кислота, норпинефрин, допамин	Катионит	Цитратный	Нингидрин	Определение в препаратах мозга	23
Оксилизин, гликозилированный оксизин	Дауэкс 50	Цитратный	Спектрофотометрия	—	24, 25
Серусодержащие аминокислоты	Катионит	Различные	Нингидрин	—	26
Изомеры 4-оксиолеицина	Катионит	Цитратный	Нингидрин	—	27
Основные аминокислоты	DC-4A	Цитрат натрия	Фталевый альдегид, флуориметрия	—	28

Продолжение табл. 2.1

Исследуемые соединения	Смолы	Буферные растворы	Обнаруживающий реагент : метод обнаружения	Примечания	Литература
Пептиды, содержащие остатки метионина	Аминекс А5	Пиридин-ацетатный	Нингидрин + измерение радиоактивности в жидкостном сцинтиллаторе	—	29
Фракции пептидов	Бекман W-3	Пиридин-ацетатный	Кадмий-нингидриновый	—	30
Пептиды инициации	Катионит	Цитрат натрия	Нингидрин	—	31
Обычные пептиды	Катионит	Водные	Нингидрин	—	32, 33
Аминокислоты в воде	Катионит	Различные	Нингидрин	Определение микроколичеств	34, 35
Обычные аминокислоты	Катионит	Цитрат натрия	Нингидрин	Разделение оптических изомеров	36
Leu-Ala-Gly-Val	Сульфированный полистирол	Цитрат натрия	Нингидрин	Оценка степени рацемизации	37

а Пролин и оксипролин не взаимодействуют с фталевым альдегидом, поэтому эти аминокислоты предварительно превращают в аминокислоты путем обработки гипохлоритом натрия в щелочной среде. — *Прим. перев.*

изменения, и все достижения в этой области связаны только с техническими усовершенствованиями. Поэтому в настоящей главе мы не будем рассматривать методику предварительной обработки образцов, обсуждать требования, предъявляемые к внутренним стандартам, смолам, буферным растворам, а также разбирать конструкцию детекторов и методики проведения расчетов и составления программ. Сведения по этим вопросам можно почерпнуть в третьем издании книги [1]. Здесь же мы лишь в общих чертах коснемся новых работ в этой области. Ссылки на некоторые появившиеся за последние годы статьи по ионообменной хроматографии аминокислот и пептидов приведены в табл. 2.1.

2.2.2. Разделение аминокислот, дипептидов и олигопептидов

В 1966 г. Томмел и др. [38, 39] предложили метод отделения пептидов от аминокислот, основанный на ионообменной хроматографии их комплексов с ионами меди. Вслед за этими первыми исследованиями появились работы, посвященные использованию данного метода для анализа различных биологи-

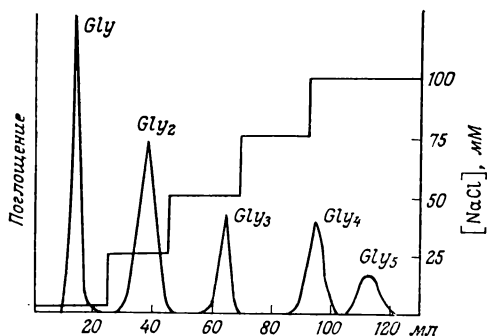


Рис. 2.1. Разделение олигоглициновых комплексов меди(II) на DEAE-сефадексе А-25 [47] (с разрешения авторов).

ческих образцов, например сусла [40], сыра [41, 42, 46], дрожжей [42], сыворотки [43] и мочи [43—45]. Медные комплексы аминокислот элюируют с анионообменной колонки при pH 8, а при последующем промывании колонки кислым буферным раствором получают фракцию пептидов, прямое обнаружение которых, однако, невозможно в силу чрезвычайно низкой устойчивости медных комплексов при pH < 7.

Этот недостаток метода удалось преодолеть Нидервизеру и др. [44, 45], которые использовали один рабочий буферный раствор с pH 8 и две колонки с DEAE-сефадексом А-25 и с DEAE-сефадексом А-50. На первой колонке аминокислоты отделяли от пептидов, а на второй — дипептиды от олигопептидов. Авторы предположили также, что с помощью предложенного ими метода можно отделить три- и тетрапептиды от пентапептидов и более длинных олигопептидов. Изучение влияния ион-

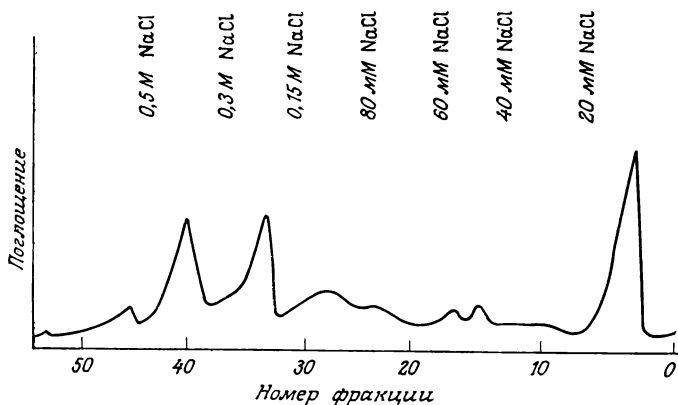


Рис. 2.2. Фракционирование комплексов меди(II) с продуктами гидролиза казеина на DEAE-сефадексе А-25 [47] (с разрешения авторов).

ной силы, pH, количества связанных с сефадексом ионов меди и концентрации образца на разрешающую способность колонок позволило значительно улучшить методику отделения пептидов от больших количеств аминокислот, а также осуществить разделение смеси пептидов [46]. На рис. 2.1 показана хроматограмма, полученная при разделении олигопептидов с различной длиной цепи на DEAE-сефадексе А-25. Ступенчатое увеличение ионной силы элюирующего буферного раствора (борат натрия, pH 8,5, с добавкой хлорида натрия) позволяет полностью разделить смесь, состоящую из пяти компонентов. Выделить гексаглицин не удалось вследствие его аномального поведения. Применимость этой схемы проверена на примере разделения ферментативного гидролизата казеина (так называемого аминокзола), из которого диализом были предварительно удалены длинные пептиды (рис. 2.2). Как выяснилось, многие компоненты смеси, которым на хроматограмме соответствуют десять пиков, удерживаются на ионите сильнее, чем любой из исследованных модельных пептидов. По мнению авторов, это обусловлено высоким содержанием кислых аминокислот в пептидах аминокзола.

2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография аминокислот и пептидов

Адсорбционная хроматография аминокислот на неполярных неподвижных фазах, впервые предложенная в сороковых годах, в период после пятидесятих годов в какой-то степени утратила свое значение в связи с разработкой метода ионообменной хроматографии. Однако развитие высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) вновь пробудило интерес к этим фазам. Сравнивая методы ВЭЖХ, ионообменной и газовой хроматографии применительно к разделению аминокислот, следует иметь в виду, что автоматическое оборудование для ионообменной хроматографии дорого и пригодно только для анализа аминокислот*, причем полное разделение 20 природных аминокислот занимает около 60 мин, для газохроматографического анализа необходима предварительная модификация аминокислот с целью получения их летучих производных, что возможно далеко не во всех случаях. Однако метод ВЭЖХ является весьма гибким и с помощью сравнительно недорогого оборудования позволяет решать разнообразные проблемы, связанные с изучением различных веществ. В частности, 20 аминокислот можно разделить данным методом менее чем за 40 мин. В результате многочисленных систематических исследований сорбентов установлено, что химически связанные фазы являются наилучшими для анализа аминокислот и пептидов.

2.3.1. Детекторы:

Такой универсальный детектор, каким хотелось бы располагать исследователям, в настоящее время еще не разработан, и метод ВЭЖХ не располагает прибором, который по своим возможностям был бы эквивалентен применяемым в газовой хроматографии детекторам по теплопроводности и пламенно-ионизационным детекторам. В этом разделе будут описаны детекторы, наиболее широко используемые для обнаружения аминокислот и пептидов. Более подробную информацию о преимуществах, ограничениях и характеристиках различных систем обнаружения можно найти в работах [48, 49].

* В последние годы фирма Pharmacia (Швеция) наладила выпуск сравнительно дешевой автоматической системы быстрого разделения белков (FPLC-системы), которую в принципе можно использовать и для разделения аминокислот. — *Прим. перев.*

2.3.1.1. Ультрафиолетовые детекторы

Уф-детекторы, получившие наиболее широкое распространение, позволяют с высокой чувствительностью обнаруживать вещества, поглощающие свет в области от 190 до 600 нм (предел обнаружения составляет несколько нанограммов), и обладают достаточной стабильностью по отношению к изменениям скорости потока элюата и температуры. Широкий диапазон измерений (около 10^5) дает возможность определять как большие, так и следовые количества веществ в одном эксперименте. Уф-спектрофотометры позволяют проводить измерения либо в максимуме полосы поглощения, либо при длине волны, обеспечи-

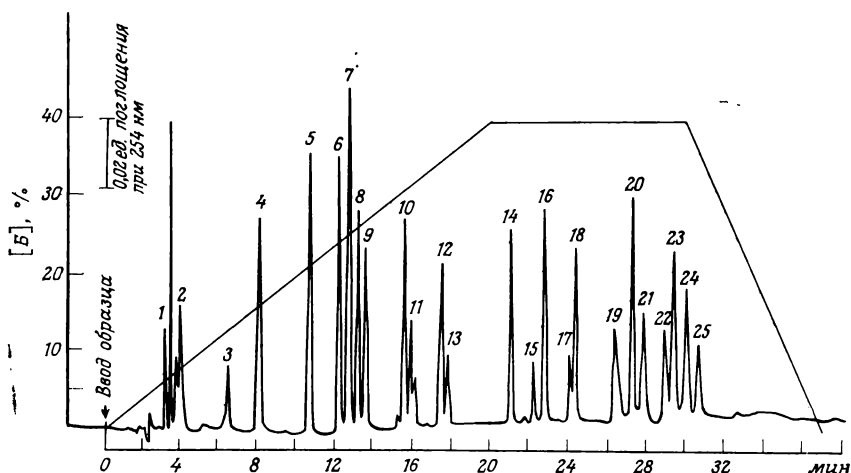


Рис. 2.3. Разделение методом ВЭЖХ на ультрафасер-ODS фенилтиогидантоиновых производных аминокислот [54] (с разрешения авторов).

Буферный раствор А: 5% тетрагидрофурана в 4,2 мМ уксусной кислоте плюс NaOH до pH 5,16; буферный раствор Б: 10% тетрагидрофурана в ацетонитриле; скорость потока: 1,3 мл/мин; температура: 45 °С; проба: 1–2 нмоль каждого производного. Идентифицированы фенилтиогидантоиновые производные следующих соединений: 1 — цистеиновой кислоты; 2 — аспарагиновой кислоты; 3 — S-карбоксиметилцистеина; 4 — глутаминовой кислоты; 5 — аспарагина; 6 — серина; 7 — глутамина; 8 — треонина; 9 — глицина; 10 — гистидина; 11 — метионинсульфона; 12 — аланина; 13 — оксипролина; 14 — тирозина; 15 — S-метицистеина; 16 — пролина; 17 — метионина; 18 — валина; 19 — аргинина; 20 — триптофана; 21 — фенилаланина; 22 — изолейцина; 23 — ε-фенилтиокарбамоиллизина; 24 — лейцина; 25 — норлейцина.

вающей максимальную селективность. Новый тип детектора с фиксированной длиной волны 215 нм выпускает фирма Pharmacia. Некоторые детекторы регистрируют спектр поглощения вещества при остановке потока, проходящего через измерительную ячейку. С помощью устройств для быстрого сканирования [50–53] можно было бы получить максимум информации о спектральных характеристиках анализируемых соедине-

ний, а соответствующий метод мог бы служить альтернативой или по меньшей мере дополнением к методу хроматомасс-спектрометрии. Подобные приборы пока не выпускаются*, однако можно надеяться, что они войдут в практику исследования в качестве многоцелевых систем детектирования.

В работе [54] описано разделение гидролизата полипептидов на колонке с ультрасфер-ODS. Аминокислоты предварительно превращали в фенилтиогидантоиновые производные, которые в элюате обнаруживали по поглощению при 254 нм. Из представленной на рис. 2.3 типичной хроматограммы видно, что все 25 компонентов смеси хорошо разделяются за 32 мин.

2.3.1.2. Флуориметрические детекторы

Флуориметры, измеряющие энергию излучения возбужденных УФ-светом молекул растворенного вещества, оказались очень чувствительными и селективными детекторами для ВЭЖХ. В тех случаях, когда сам по себе образец не флуоресцирует, можно до или после разделения образца на колонке получить соответствующие его производные. Чувствительность флуориметров может в 100 раз превышать чувствительность УФ-детекторов, однако для первых характерен более узкий линейный диапазон измерений (10^4).

Очень перспективным является флуориметр с лазерным возбуждением [55], который в принципе позволяет проводить анализ вещества в количестве нескольких пикограммов. На рис. 2.4 приведен пример разделения аминокислот в виде их производных, полученных в предколоночном реакторе в результате длившейся 1 мин обработки исходной смеси *о*-фталевым альдегидом [56]. Предел обнаружения этих производных обычным флуориметрическим детектором составляет в среднем 40 пг.

2.3.1.3. Электрохимические детекторы

Вещества, обладающие способностью окисляться или восстанавливаться под действием электрического тока, можно обнаруживать с помощью электрохимических детекторов, которые регистрируют зависимость величины тока между поляризуемым электродом и электродом сравнения от приложенного напряжения. Детекторы такого типа пока еще только начинают разрабатываться, и поэтому многие проблемы еще ждут своего окончательного решения. Тем не менее такие приборы представля-

* Выпуск детекторов, позволяющих получать трехмерные хроматограммы (время — длина волны — поглощение), уже налажен фирмами Hewlett Packard и ЛКВ. — *Прим. перев.*

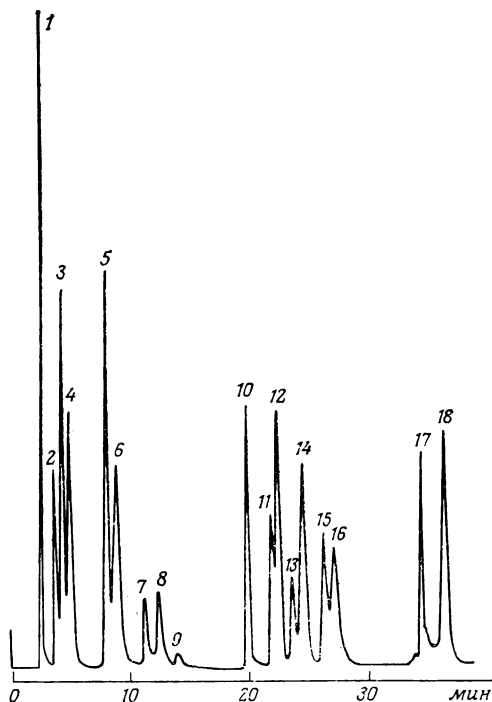


Рис. 2.4. Разделение методом ВЭЖХ производных аминокислот, полученных обработкой аминокислот фталевым альдегидом [56] (с разрешения авторов).

Колонка: 150×5 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: микросил C_8 ; 0,02 М подвижная фаза: раствор ацетата натрия (рН 5) — тетрагидрофуран — метанол, ступенчатое градиентное элюирование; скорость потока: 2 мл/мин; обнаружение: по флуоресценции. Идентифицированы производные следующих соединений: 1 — аспарагиновой кислоты; 2 — треонина; 3 — серина; 4 — глутаминовой кислоты; 5 — глицина; 6 — аланина; 7 — тирозина; 8 — валина; 9 — цистеина; 10 — гистидина; 11 — метионина; 12 — глутамина; 13 — изолейцина; 14 — лейцина; 15 — фенилаланина; 16 — аргинина; 17 — триптофана; 18 — аммияка.

ются весьма перспективными, поскольку используемый в них принцип обнаружения веществ может обеспечить высокую чувствительность и широкий диапазон измерений. Результаты принятых к настоящему времени исследований указывают на то, что электрохимические детекторы обладают, как правило, большей чувствительностью, но меньшей селективностью, чем флуориметрические.

2.3.1.4. Масс-спектрометры

Масс-спектрометр удовлетворяет в принципе всем основным требованиям, предъявляемым к детекторам для ВЭЖХ, а именно: он универсален, обладает высокой чувствительностью, ха-

рактеризуется широким диапазоном измерений и стабилен по отношению к изменениям температуры. Однако жидкостной хроматограф менее пригоден для использования в сочетании с масс-спектрометром, чем газовый. Серьезные затруднения, возникающие при конструировании такой комбинированной системы, связаны, как правило, с характером подвижной фазы, скоростью потока и низкой летучестью образцов. Один из возможных способов решения этих проблем заключается в том, чтобы хроматограф и масс-спектрометр работали в автономном режиме [57, 58].

Начиная с 1974 г. изучено несколько вариантов сочетания жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией [59—72]. Обзоры на эту тему опубликованы Макфадденом [73], Арпино и Гиошоном [74], Кендлером и Шмидом [75]. Однако, несмотря на громадные усилия, предпринимаемые в этом направлении, в настоящее время доступны только два типа устройств, объединяющих в одну систему жидкостной хроматограф и масс-спектрометр. В одном из них, предложенном МакЛафферти и др. [61], элюат и подвижная фаза из колонки поступают непосредственно в спектрометр и подвижная фаза используется одновременно в качестве газа-реагента для химической ионизации. В этом относительно недорогом и несложном устройстве ионизация осуществляется таким методом, который наиболее пригоден для труднолетучих и термически нестойких соединений. Однако низкая летучесть обычно используемых растворителей (особенно в ВЭЖХ на обращенных фазах) ограничивает применение этого метода.

Основной деталью второго устройства является движущаяся лента, на поверхность которой подается элюат [63]. После испарения растворителя образец переводят в газовую фазу с помощью методов электронного удара или химической ионизации и анализируют*.

Роль соединительного звена между микроколонкой и масс-спектрометром может выполнять сконструированный Такеучи и др. [69] струйный сепаратор. В этом устройстве при скоростях потока порядка нескольких микролитров в минуту подвижная фаза вновь выступает в роли газа-реагента, приводящего к хи-

* Простой и чувствительный двухступенчатый метод «хроматографического магнитофона» был предложен Березкиным, Савиновым и Яшиным [Berezkin V. G., Savinov I. M., Yashin G. I., *J. Chromatogr.*, **150**, 200 (1978)]. На первой стадии детектирования элюент непрерывно наносится на движущуюся металлическую ленту. Нелетучие анализируемые вещества остаются на ленте, а растворитель испаряется. На второй стадии лента с анализируемыми веществами пропускается через детектор (например, масс-спектрометр), который используется для качественного и количественного определения хроматографически разделенных веществ. — *Прим. ред.*

мической ионизации. Следует отметить, что в такой системе возможности ВЭЖХ ограничены в связи с необходимостью работать лишь с подходящими для масс-спектрометрии растворителями и с определенным количеством образца.

Каргер и др. [76] предложили перспективную методику ввода анализируемых веществ в масс-спектрометр. Разработанное ими устройство представляет собой модифицированный проточный экстрактор, в котором вещества извлекаются из элюата со-

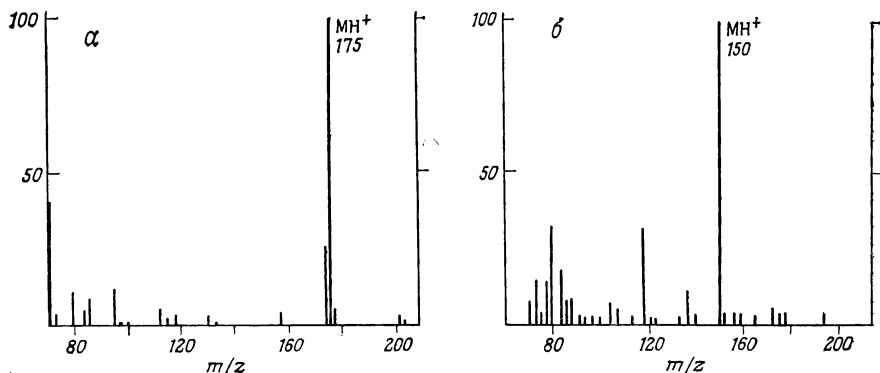


Рис. 2.5. Масс-спектры аргинина (а) и метионина (б), полученные масс-спектрометрией положительно заряженных ионов в сочетании с ВЭЖХ [66] (с разрешения авторов).

Подвижная фаза: муравьиная кислота; скорость потока: 0,5 мл/мин; концентрация аминокислот: 50 мг/л; объем пробы: 20 мкл.

ответствующим органическим растворителем и после испарения последнего на движущейся ленте попадают в масс-спектрометр. Такое устройство позволяет использовать разнообразные подвижные фазы, в том числе и содержащие неорганические буферные растворы.

Для быстрого испарения элюата Блэкли и др. [66] использовали кислородно-водородное пламя. Этими авторами установлено, что для анализа биологических препаратов требуется 1–10 нг вещества при условии записи полного масс-спектра и менее 1 нг при обнаружении элюата по заранее выбранным в масс-спектре ионам. Авторы использовали эту методику для масс-спектрометрического анализа аминокислот. Полученные спектры очень просты и содержат в основном пики, отвечающие протонированным молекулярным ионам MH⁺ (рис. 2.5). Исключение составляют лишь лизин и гистидин, в масс-спектрах которых интенсивность пиков MH⁺ составляет соответственно 60 и 80%. Ограниченная фрагментация молекул позволяет отличить глутаминовую кислоту от лизина, однако лейцин и изолей-

цин неразличимы. Характерное для данного примера снижение предела обнаружения вещества по сравнению с обычным методом химической ионизации обусловлено значительным снижением уровня фона.

Таблица 2.2. Относительная чувствительность анализа аминокислот методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [66]

Тип аминокислот	Аминокислота	Молекулярная масса	Относительная интенсивность пика MH^+a
Алифатические	Глицин	75	100
	Аланин	89	130
	Валин	117	210
	Изолейцин	131	233
	Лейцин	131	240
	Пролин	115	249
Гидроксилсодержащие	Серин	105	66
	Треонин	119	114
Дикарбоновые и амиды	Аспарагиновая кислота	133	41
	Аспарагин	132	65
	Глутаминовая кислота	147	93
	Глутамин	146	31
Основные	Лизин	146	38
	Гистидин	155	68
	Аргинин	174	73
Ароматические	Фенилаланин	165	136
	Тирозин	181	49
	Гриптофан	204	66
Серусодержащие	Цистеин	121	13
	Метионин	149	15

^a За 100 принята интенсивность пика, отвечающего псевдомолекулярному иону глицина.

В табл. 2.2 приведены величины относительной чувствительности обнаружения 20 аминокислот, представляющие собой усредненные значения интегральной интенсивности пиков MH^+ на нескольких масс-хроматограммах. Установлено, что в условиях съемки полного масс-спектра предел обнаружения аргинина и метионина составляет соответственно 0,5 и 2,5 нг (отношение сигнал/шум равно 2), а при детектировании по заранее выбранному в спектре ионам этот предел можно снизить в 10 раз.

Дезидерио и др. [77] использовали жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрическим методом полевой десорбции для анализа смесей олигопептидов гипоталамуса, содержащих от 3 до 31 аминокислотного остатка. В описанном варианте хроматограф и масс-спектрометр работали в автономном режиме, хотя элюат можно анализировать и непо-

Таблица 2.3. Сравнение некоторых детекторов, применяемых в жидкостной хроматографии

Тип детектора	Общая характеристика	Возможность использования в режиме градиентного элюирования	Предел обнаружения	Область линейности	Чувствительность к изменению скорости потока	Чувствительность к изменению температуры	Литература
УФ-детектор	Селективный	Да	10^{-9}	10^5	Нечувствителен	Низкая	48
Флуориметр	Селективный	Да	10^{-12}	10^3	Нечувствителен	Низкая	48
Электрохимический	Селективный	Нет	10^{-12}	10^6	Чувствителен	Дрейф базовой линии 1,5%/°C	48
Масс-спектрометр: в режиме съемки полного спектра	Универсальный	Да	10^{-9}	10^4	Нечувствителен	Нечувствителен	66
в режиме обнаружения по выбранному иону	Селективный	Да	10^{-11}	10^4	Нечувствителен	Нечувствителен	66

средственно с помощью метода полевой десорбции. Анализ олигопептидов методом жидкостной хроматографии описан также в работе [78]. Приведенные примеры иллюстрируют новые методы изучения структуры индивидуальных пептидов и определения их содержания.

В заключение необходимо отметить, что, несмотря на достигнутые успехи, множество все еще нерешенных проблем ограничивает применение ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией. Масс-спектрометр был бы почти идеальным детектором для жидкостной хроматографии, однако высокая стоимость и сложность эксплуатации прибора отнюдь не способствуют расширению круга его потенциальных потребителей. Основные характеристики описанных типов детекторов приведены в табл. 2.3.

2.3.2. Разделение аминокислот

Методика анализа свободных аминокислот описана Шустером [79]. На колонке, заполненной лихросорбом NH_2 (размер частиц 5 мкм), используя градиентное элюирование смесью ацетонитрил — фосфатный буферный раствор, он за 30 мин разделил около 20 аминокислот, входящих в состав растворов для внутривенного введения. Обнаружение свободных аминокислот проводилось по их поглощению при 200 нм, а их идентификация — по времени удерживания. Чтобы подтвердить отнесение пиков, спектры поглощения всех выделенных компонентов сравнивались со спектрами чистых препаратов аминокислот. В этой статье, как и в работах, посвященных анализу аминокислот в виде их производных, содержится утверждение, что картина разделения очень сильно зависит от температуры колонки, а также от условий ее эксплуатации. Согласно данным Шустера, снижение эффективности колонки может привести к тому, что аспарагину, глутамину и глицину на хроматограмме будет соответствовать один пик. Авторы работ [54, 80] исследовали влияние различных факторов на время удерживания компонентов смеси и на разрешающую способность колонки более детально.

Вышеописанный метод анализа свободных аминокислот экономит время и труд исследователя и является более строгим, чем методы, основанные на получении производных аминокислот или на их экстракции, однако чувствительность его явно недостаточна для обнаружения небольших количеств аминокислот в биологических препаратах. Именно поэтому аминокислоты чаще всего определяют в виде их метилтиогидантоиновых [81], фенилтиогидантоиновых (ФТГ) [82], диметиламинафталинсульфонильных (дансильных, или ДНС) [83], 2,4-динитрофенильных (ДНФ) [84], 2,4,6-тринитробензолсульфонильных

Таблица 2.4. Разделение аминокислот и их производных методом ВЭЖХ

Сорбент	Аминокислоты	Модифицирующий реагент	Способ по- лучения производ- ных: до или после раз- деления	Режим детектирования			Предел обнару- жения	Примечания	Литература
				по погло- щению (λ , нм)	по флуорес- ценции				
Лихросорб NH ₂ Амберлит XAD-2, 4 и 7 μ-Бондапак C ₁₈ Лихросорб SI-60	Обычные Обычные	Динитрофторбензол или дансилхлорид		200 254, 208	340	510	пмоль/мл	Зависимость предела обнару- жения от pH, времени реакции и кон- центрации дан- силхлорида	83
				254					84
	Обычные Обычные	Метилэтилоксианат Дансилхлорид							85
				250			100 пмоль		87
μ-Бондапак C ₁₈ , сферисорб 50-DS	Обычные	Дансилхлорид		250				Сравнение двух сорбентов	88
Лихросорб RP-8	Фенилаланин	Дансилхлорид	До		320	552	250 пмоль		89
Микросил C-8	Обычные	Фталевый альдегид	До		340	450	40 пг		90
μ-Бондапак C ₁₈ , лихросорб RP-8	Обычные	Фталевый альдегид	До		229	470			91
Партисил SCX-10	Триптофан	Фталевый альдегид	После До		370	475	10 пг		92
Нуклеосил RP-8	Обычные	Фталевый альдегид			330	418	50 фмоль		93
μ-Бондапак C ₁₈ , 1-метилгистидин, гистидин	3-Метилгистидин, 1-метилгистидин, гистидин	Фталевый альдегид	После		340	440	нг		94

Продолжение 2.4.

Сорбент	Аминоислоты	Модифицирующий реагент	Способ определения: про- лучения после выноса из раствора	Режим детектирования			Предел обнару- жения	Примечания	Литература
				по погло- щению (λ , нм)	по флуорес- ценции ($\lambda_{\text{возб.}}$, нм)	$\lambda_{\text{ист.}}$, нм			
Микропак МСН-5	Обычные	Фталевый альдегид	До		340	455	пмоль		95
Сферисорб 55-W с привитыми ос- татками аминов	Серусодержащие	Динитрофторбензол	До	350—355			нмоль		96
Зорбакс ODS	Обычные	Динитрофторбензол	До	360				Применение в клинической ме- дицине	97
Кнауэр RP-8	Обычные	Диметиламинофе- нилэтилоксианат	До	436			8 пмоль	Применение в клинической ме- дицине	98
μ -Бондапак C ₁₈	3-Метилгистидин	Флуорескамин	До		365	460			99

[85], флуорескаминовых [86] и других производных. В табл. 2.4 приведены ссылки на ряд опубликованных в последнее время работ, в которых описано разделение различных производных аминокислот*.

Для идентификации аминокислот наиболее широко используются их ФТГ-производные. В работе [54] описано разделение двадцати пяти ФТГ-аминокислот градиентным элюированием на колонке с ультрасфер-ODS (рис. 2.3). Как показывают данные этой работы, разрешающая способность колонки сильно зависит от pH и ионной силы элюента, скорости потока, а также от температуры предварительной и основной колонок. По этой причине часто трудно установить точное положение пиков, отвечающих ФТГ-производным основных и кислых аминокислот. Даже незначительное изменение pH сильно сказывается на времени удерживания ФТГ-Asp и ФТГ-Glu, а ФТГ-His и ФТГ-Arg могут при этом элюироваться одновременно. С увеличением pH от 3,5 до 6,0 уменьшается время удерживания производных кислых и основных аминокислот, тогда как увеличение концентрации ацетат-ионов при постоянном значении pH приводит к уменьшению времени удерживания только ФТГ-производных основных аминокислот. Установлено также, что оптимальное разрешение пиков, отвечающих ФТГ-производным метионина, валина, лизина и изолейцина, достигается при скорости потока 1,3 мл/мин. Полный анализ занимает 32 мин, коэффициент вариации составляет от 0,3 для ФТГ-валина до 2,9 для ФТГ-(S-карбоксиметил)цистеина (приведенные значения получены по результатам 27 опытов).

В табл. 2.5 суммированы результаты относительно недавно опубликованных работ, посвященных разделению ФТГ-производных аминокислот методом ВЭЖХ. Сведения о более ранних публикациях содержатся в кратком обзоре [117]. Данные, приведенные в табл. 2.5, показывают, что наибольшее распространение в настоящее время получили химически привитые углеродородные фазы. В литературе отсутствуют данные об использовании микроколонок**, хотя по своим характеристикам они превосходят или по крайней мере не уступают колонкам, внутренний диаметр которых равен или превышает 4 мм [118]. Спо-

* Методика полного разделения 23 моно- и дидансилпроизводных 20 распространенных аминокислот методом ВЭЖХ описана в работе: *Levina N. B., Nazimov V., J. Chromatogr.*, 286, 207 (1984). Продолжительность разделения 26 мин, предел обнаружения 100 пмоль (при использовании УФ-детектора, 254 нм). — *Прим. ред.*

** В СССР разработан и производится жидкостный хроматограф «Мили-хром» с капиллярными микронасадочными колонками. Обзоры по колонкам этого типа см. в статьях: *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Мальцев В. Г.* — Журнал ВХО им. Д. И. Менделеева, 1983, 28, с. 43; *Novotny M., Anal. Chem.*, 53, 1294A (1981). — *Прим. ред.*

Таблица 2.5. ВЭЖХ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот

Сорбент	Размер колонки, см×мм	Элюент	pH	Число аминокислот	Время анализа, мин	Литература
μ-Бондапак C ₁₈	30×3,9	NaOAc—MeCN	6	15	20	100
μ-Бондапак C ₁₈	30×3,9	NaOAc—MeOH; MeOH—H ₂ O	5,3	17	16	101
μ-Бондапак C ₁₈	30×4,0	NaOAc—MeCN	4,0	7	15	102
μ-Бондапак C ₁₈	30×4,0	H ₂ O, MeOH, AcOH, Ac ₂ O	4,1	18	20	103
μ-Бондапак C ₁₈	30×0,4	NaOAc—MeOH	4,0	18	32	104
Лихросорб RP-8, 5 мкм	30×3,9	NaOAc—MeCN	4,6	17	60	105
Лихросорб RP-8, 10 мкм	24×4,6	NaOAc—MeOH	4,9	16	25	106
Гиперсил ODS, 5 мкм	23×4,6	NaOAc—H ₂ O	4,9	18	45	107
Сферисорб ODS, 5 мкм	9×0,5	NaOAc—MeOH	5,3	7	25	108
ODS-18, 5 мкм		NaOAc—MeOH; H ₂ O—MeCN, Me ₂ CHOH		6	40	109
Зорбакс ODS	25×4,6	NaOAc—MeCN	5,0	20	20	110
Партирил 10 с привитым трипептидом L-Val-L-Ala-L-Pro	30×2,1	1%-ный водный раствор лимонной кислоты	2,5	9	40	111
μ-Бондапак C ₁₈	30×3,9	20%-ный раствор MeOH в 5 мМ NaOAc; 38%-ный водный метанол	5,6	15	45	112
μ-Бондапак C ₁₈	30×4,0	8,0 мМ диэтилтриамин; 20 мМ трихлоруксусная кислота	4,2	17	36	113
μ-Бондапак C ₁₈	30×4,0	0,02 н. NaOAc—MeCN (9:1)	3,7	19	26	114
μ-Бондапак C ₁₈	30×4,0	0,01 н. NaOAc—MeCN (9:1)	4,0	20	36	115
Сферисорб ODS, 5 мкм	25×4,6	0,2 М Li OAc—MeCN (1:4)	5,2	19	18	116
Лихросорб RP-18	25×4,6	0,1 М LiOAc—MeCN (1:4)	5,2	5	Нет данных	54
Ультрасфер-ODS	25×4,6	0,01 М NaOAc—MeCN—диметилсульфоксид (5:3:2)	4,5	25	32	117
Лихросорб RP-18, 5 мкм	25×3,0	0,0042 М AcOH, доведенная до pH 5,16 путем добавления NaOH; 5%-ный тетрагидрофуран	5,16	16	32	117

собы заполнения очень длинных насадочных микроколонок известны, причем такие колонки должны иметь значительно большее число теоретических тарелок по сравнению с обычными, поскольку эффективность колонки линейно возрастает с увеличением ее длины. Еще одним преимуществом микроколонок является более низкая объемная скорость потока, что существенно снижает стоимость одного анализа (например, при замене колонки с внутренним диаметром 4,6 мм на колонку, внутренний диаметр которой равен 1 мм, стоимость анализа может снизиться в 20 раз). Скотт [119] пришел к выводу, что микроколонки, по-видимому, предпочтительнее обычных, так как обеспечивают быстрое и эффективное разделение при низкой скорости потока. Микроколонки используются в настоящее время довольно редко по следующим причинам: во-первых, они стали доступны лишь недавно, во-вторых, для их соединения с детекторами и инжекторами требуются специальные переходники и, в третьих, заполнение таких колонок сорбентом представляет собой довольно сложную процедуру. Проведенное Годтфредсеном и Оливером [117] сравнение характеристик колонок с различным внутренним диаметром показало, что при соответствующем изменении условий хроматографирования можно добиться одинаковой эффективности разделения на колонках с внутренним диаметром от 3 до 1,5 мм.

2.3.3. Разделение энантиомеров аминокислот

Разделение энантиомеров аминокислот представляет не только теоретический интерес в связи с изучением механизма взаимодействия хиральных молекул, но и имеет практическое значение как метод анализа биологических объектов и способ оценки степени рацемизации синтетических аминокислот и пептидов. Газовая хроматография позволяет разделять энантиомеры аминокислот только в виде их производных [120] (см. разд. 2.4.1.3), причем препаративное разделение сопряжено со значительными трудностями. Поэтому предпринимались многочисленные попытки разделить смесь энантиомеров, используя метод жидкостной хроматографии [121, 122]. Существует два подхода к решению этой задачи. Один из них сводится к превращению энантиомеров в диастереомеры до их разделения [123], а второй, наиболее часто используемый в настоящее время, заключается в том, что диастереомеры образуются в процессе хроматографирования в результате взаимодействия энантиомеров с оптически активным реагентом, присутствующим либо в подвижной, либо в неподвижной фазе.

В 1972 г. Снайдер и др. [124] применили в качестве хиральной неподвижной фазы аминокислоты, привитые к полимерным

сферическим частицам, а в подвижную фазу ввели ионы металлов (Zn^{2+} или Cu^{2+}). Взаимодействие этих ионов с ковалентно связанными аминокислотами привело к образованию комплексов, обладающих стереоселективностью по отношению к D- или L-аминокислотам [125—129]. В работах [130—133] описаны аналогичные методики разделения смеси энантиомеров, но без использования ионов металлов [130—133].

Возможен и альтернативный подход к разделению энантиомеров: асимметрический реагент добавляют к подвижной фазе [134—140]. Такими реагентами могут служить различные комплексы ионов металлов. Например, авторы работы [140] предлагают проводить разделение аминокислот в виде их комплексов с L-аспартилциклогексиламидмедью(II), которые можно обнаруживать в элюате по поглощению при 230 нм. В табл. 2.6

Таблица 2.6. Коэффициенты емкости (k') энантиомеров некоторых аминокислот и селективность [$\alpha = k'(D)/k'(L)$] их разделения в присутствии комплекса L-аспартилциклогексиламида и меди(II) [140]

Аминокислота	$k'(L)$	$k'(D)$	α	$k'(L)$	$k'(D)$	α	$k'(L)$	$k'(D)$	α
	концентрация L-аспартилциклогексиламида, мМ								
	1,0			0,25			0,1		
Пролин	0,24	1,12	4,46	0,55	1,42	2,58	2,17	3,0	1,38
Валин	0,41	0,82	2,0	1,07	1,52	1,42	1,83	2,17	1,18
Норвалин	0,56	0,89	1,59	1,14	1,43	1,25	1,74	2,0	1,15
Цистеин	0,76	1,15	1,51	1,81	2,43	1,34	—	—	—
Метионин	1,41	2,06	1,46	2,52	3,29	1,30	3,7	4,4	1,19
3,4-Диоксифенилаланин	1,78	2,33	1,31	3,21	3,90	1,22	5,67	6,86	1,21
Изолейцин	1,76	3,76	2,14	2,86	5,0	1,75	4,5	7,0	1,55
Лейцин	2,35	3,88	1,65	3,23	4,63	1,43	5,19	6,81	1,31
Норлейцин	2,47	4,23	1,71	3,67	5,40	1,47	5,13	6,76	1,32
Тирозин	3,03	4,5	1,48	5,02	6,98	1,39	7,03	8,86	1,26
Этионин (S-этилгомо- цистеин)	4,65	6,64	1,43	7,14	9,43	1,32	10,7	12,8	1,2

приведены коэффициенты емкости и селективности этого реагента по отношению к энантиомерам некоторых аминокислот. Используя L-2-изопропил-4-октилдиэтилтриаминцинк(II), Линднеру и др. [139] удалось разделить смесь всех обычных аминокислот, кроме пролина. В отличие от авторов других работ Линднер и сотр. проводили разделение дансильных производных аминокислот. В работе [139] рассматривается также влияние pH, ионной силы и природы ионов металлов (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} и Zn^{2+}) на хроматографические характеристики энантиомеров.

Хар и Гил-Ав [136] разделили свободные аминокислоты на ионообменной смоле, используя в качестве хиральной добав-

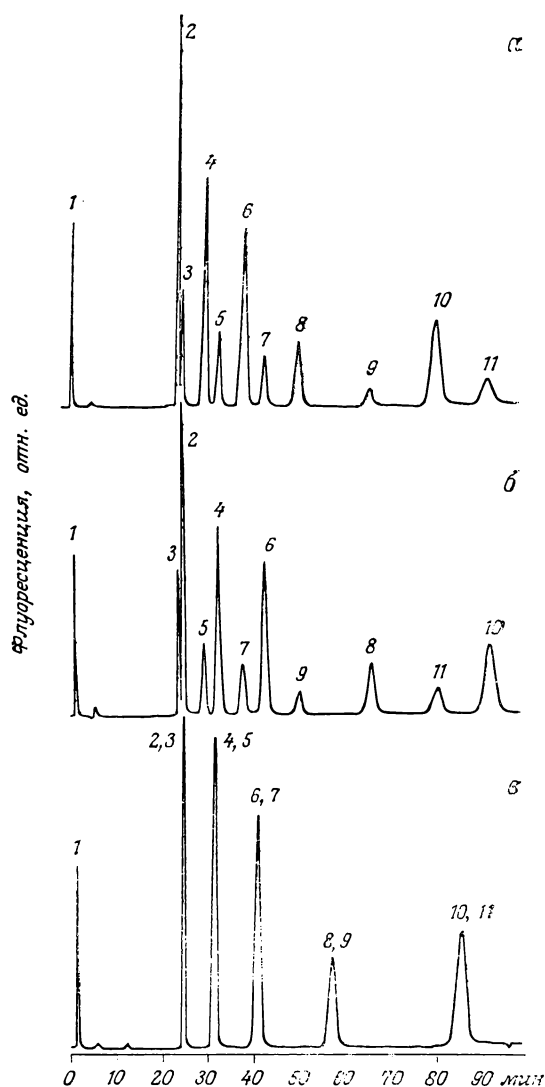


Рис. 2.6. Влияние хиральной добавки к элюенту на разделение D- и L-энантиомеров аминокислот методом лигандообменной ВЭЖХ [136] (с разрешения авторов).

Колонка: 12×0,2 см (внутр. диаметр); неподвижная фаза: катионит дуррум DC-4A; температура: 75°C; подвижная фаза: 0,05 M раствор ацетата натрия (pH 5,5), содержащий 4 mM CuSO_4 и 8 mM L-пролина (а), D-пролина (б) или DL-пролина (в); скорость потока: 10 мл/ч; давление 20 МПа; обнаружение: по флуоресценции (после реакции со фталевым альдегидом). Идентифицированы следующие соединения: 1 — цистеиновая кислота; 2 — L-серин; 3 — D-серин; 4 — L-валин; 5 — D-валин; 6 — L-изолейцин; 7 — D-изолейцин; 8 — L-тирозин; 9 — D-тирозин; 10 — L-фенилаланин; 11 — D-фенилаланин.

ки к подвижной фазе пролинмедь(II). На рис. 2.6 приведены хроматограммы, полученные с L-, D- и DL-пролином. Изменение хиральности асимметрического реагента приводит к изменению последовательности элюирования энантиомеров, в присутствии же рацемического пролина разделения DL-пар не происходит. Чтобы провести количественное определение аминокислот, содержание которых измеряется пикомолями, их после разделения обрабатывали в дополнительной колонке фталевым альдегидом. Преимущество этого реагента заключается в том, что он не взаимодействует с пролином, тогда как с аминокислотами, содержащими первичные аминогруппы, образует интенсивно флуоресцирующие продукты.

Разделению энантиомеров аминокислот методом колоночной хроматографии посвящен обзор Ауберта [141]. Автор отмечает, что в аналитических целях более всего удобны методики, основанные на добавлении асимметрического реагента в подвижную фазу. Лефебру и др. [127] удалось полностью разделить аминокислоты, используя пористые гели на основе акриламида с привитыми остатками L- α -аминокислот, образующими комплексы с ионами металлов. Авторы [127] рассмотрели влияние структуры геля, кинетики жидкостного обмена, а также природы ионов металла и хирального привитого компонента на хроматографические характеристики энантиомеров аминокислот.

2.3.4. Разделение олигопептидов

Главное требование, предъявляемое к методикам хроматографического анализа пептидов, заключается в том, чтобы они позволяли разделять близкородственные аналоги. По традиции разделение олигопептидов проводят методом ионообменной или тонкослойной хроматографии. Однако разработанный позднее метод ВЭЖХ позволяет следить за ходом реакций, контролировать чистоту синтетических пептидов, изучать пути метаболизма, а также осуществлять препаративное разделение смесей. В силу полярности незащищенных пептидов их разделение на силикагеле сопряжено со значительными трудностями [142—144], поэтому чаще всего пептиды разделяют в виде их производных.

Введение в практику обращенно-фазовой ВЭЖХ значительно расширило возможности методов разделения и выделения олигопептидов [145—156]. Удерживание разделяемых образцов на такой фазе зависит от силы их гидрофобных взаимодействий со связанными с носителями алкильными остатками: с увеличением гидрофобности анализируемого соединения возрастает время его удерживания [145]. Присутствие полярных растворителей (например, спиртов) в элюенте или полярных функциональных

групп в молекулах разделяемых соединений снижает коэффициент емкости последних. Пептиды, содержащие остатки кислых или основных аминокислот (несущие полный электрический заряд), слабо удерживаются на обращенно-фазовых колонках. В некоторых теоретических и экспериментальных работах рассмотрено влияние сдвига вторичных равновесий, например изменения pH и образования ионных пар, на разрешающую способность колонок [154, 157—160] и показано, что для разделения пептидов наиболее предпочтительны такие методики, в которых гидрофобные или гидрофильные противоионы добавляются к элюенту при низких значениях pH. В работе [154] изучено влияние различных перфторалкановых кислот, используемых в качестве ион-парных липофильных реагентов, на удерживание немодифицированных гекса- и гептакозапептидов на ODS-силикагеле. Установлено, что при переходе от трифторуксусной к перфтордекановой кислоте время удерживания (а иногда и селективность) постепенно возрастает.

Хенкок и др. [160] исследовали влияние солей тетраалкил- и алкиламмония, а также неорганических солей на время удерживания пептидов, содержащих от двух до пяти аминокислотных остатков, на μ -бондапак-алкилфенильной фазе. Полученные результаты (табл. 2.7 и 2.8) показывают, что небольшие сильносольватируемые катионы металлов (табл. 2.8) и соли аммония (табл. 2.7) влияют на хроматографическую подвижность пептидов аналогичным образом. При переходе от солей аммония к солям

Таблица 2.7. Влияние солей тетраалкиламмония (R_4NOAc), используемых в качестве ион-парных реагентов, на время удерживания олигопептидов в условиях ВЭЖХ^a [160]

Пептид	Время удерживания, мин				
	R=H	R=CH ₃	R=C ₂ H ₅	R=C ₃ H ₇	R=C ₄ H ₉
Leu—Trp—Met—Arg	2,8	3,0	3,05	3,5	2,7
Leu—Trp—Met—Arg—Phe	5,7	6,8	6,5	8,7	4,0
Gly—Phe	2,4	2,4	2,6	2,7	2,05
Gly—Gly—Tyr	2,0	2,0	2,2	1,8, 2,05 ^b	1,7
Met—Arg—Phe	2,6	2,7	2,8	3,0	1,7
Gly—Leu—Tyr	2,4	2,5	2,8	2,7	2,1
Arg—Phe—Ala	2,3	2,3	2,6	2,1, 2,7 ^b	1,8

^a Колонка: 300×4 мм; неподвижная фаза: μ -бондапак алкилфенил, размер частиц 10 мкм; подвижная фаза: 2 мМ раствор реагента в смеси метанол—вода (1:1) pH 4; скорость потока: 1,5 мл/мин.

^b Пептиду отвечают два пика.

Таблица 2.8. Влияние ионов металлов на время удерживания олигопептидов^a [160]

Пептид	Время удерживания, мин					
	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Cs ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Leu—Trp—Met—Arg	2,9	2,9	3,0	3,4	2,8	3,2
Leu—Trp—Met—Arg—Phe	4,7	4,7	4,8	4,8	4,5	4,9
Gly—Phe	2,2	2,2	2,35	2,5	2,2	2,5
Gly—Gly—Tyr	2,1	2,1	2,3	2,4	2,2	2,3
Met—Arg—Phe	2,6	2,6	2,7	2,8	2,6	3,0
Gly—Leu—Tyr	2,3	2,3	2,5	2,7	2,3	2,5
Arg—Phe—Ala	2,3	2,2	2,45	2,8	2,3	2,6

^a Условия разделения см. в примечании к табл. 2.7.

тетрапропиламмония наблюдается некоторое увеличение времени удерживания, однако гидрофобные катионы с длинными или объемистыми углеводородными остатками (ионы тетрабутиламмония или додециламмония) вызывают значительное уменьшение времени удерживания. По мнению авторов [160], эти эффекты обусловлены, с одной стороны, изменением коэффициентов распределения ионных пар между подвижной и неподвижной фазами, а с другой — динамическими ионообменными взаимодействиями катионных реагентов.

Таблица 2.9. Время удерживания пептидов на колонке с био-рад ODS^a [161]

Соединение	Время удерживания, мин		Соединение	Время удерживания, мин	
	pH 7,4	pH 2,1		pH 7,4	pH 2,1
1. Триглицин	2,0	3,0	14. Церуленн	34,2	42,2
2. Пентааланин	4,6	8,1	15. Окситоцин	36,4	37,9
3. Дивалин	6,9	14,5	16. Фрагмент 12-15 гастрин	36,5	42,4
4. Диметионин	10,5	21,0	17. Нейротензин	39,0	48,0
5. Тиролиберин	11,5	11,2	18. Физаламин	41,0	43,0
6. Тафтсин	11,7	12,0	19. Трифенилаланин	41,6	49,5
7. Тритириозин	19,5	29,7	20. Люлиберин	42,8	49,5
8. [Met]энкефалин	27,5	38,0	21. α-Меланотропин	46,2	46,2
9. Трилейцин	28,0	36,8	22. Брадикинин	48,0	45,0
10. [Leu]энкефалин	29,3	42,0	23. Пептид, родствен- ный эледионину	53,0	44,0
11. Дитриптофан	31,6	44,3	24. Глюкагон	53,6	60,0
12. Ангиотензин II	32,2	47,5	25. Соматостатин	57,5	55,0
13. α-Эндорфин	32,3	47,7			

^a Условия разделения см. в подписи к рис. 2.8.

Лин и др. [156] изучили хроматографические свойства дипептидов, содержащих остатки кислых или основных аминокислот. Эти соединения, как и нейтральные дипептиды, в состав которых входят остатки аминокислот типа серина, пролина и треонина, слабо удерживаются на колонках с обращенной фазой,

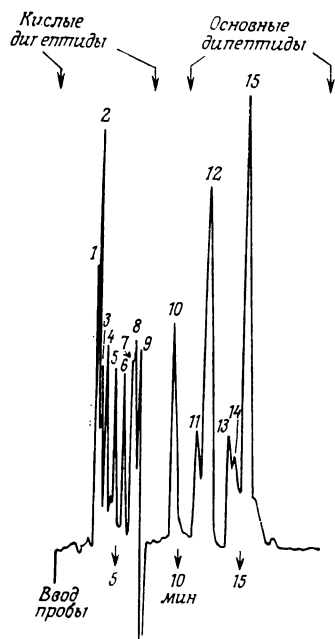


Рис. 2.7. Разделение дипептидов методом ВЭЖХ [156] (с разрешения авторов).

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; подвижная фаза: 5%-ный (по объему) раствор бутанола в воде, содержащей 0,038% октановой и 0,002% пентановой кислоты (масса/объем). Идентифицированы следующие соединения: 1 — Asp—Asp; 2 — Glu—Glu; 3 — Asp—Leu; 4 — Ala—Ala; 5 — Val—Ala; 6 — Glu—Leu; 7 — Ser—Ser; 8 — Val—Val; 9 — растворитель; 10 — Arg—Asp; 11 — Lys—Ser; 12 — His—Ala; 13 — Arg—Val; 14 — Lys—Lys; 15 — His—Phe.

этим анионом и карбоксильными группами аминокислотных остатков снижает время удерживания кислых дипептидов.

Анализ пептидов методом ВЭЖХ выглядел бы значительно проще, если бы относительное время удерживания пептида можно было предсказать исходя из его структуры. Решению этой задачи посвящена работа [161], автор которой установил, что время удерживания олигомеров аминокислот практически ли-

что создает определенные трудности при их разделении. Поэтому условия, в которых обычно проводят разделение нейтральных пептидов, в данном случае не подходят. В качестве поверхностно-активных веществ, благоприятствующих анализу смесей кислых, основных и нейтральных дипептидов, авторы [156] выбрали алифатические карбоновые кислоты. Из рис. 2.7, где показано разделение 14 дипептидов различной полярности, следует, что в этих условиях основные дипептиды хорошо отделяются от кислых и нейтральных. Если бы подвижная фаза представляла собой простой водный растворитель, т. е. не содержала ион-парных реагентов, основные и кислые соединения удерживались бы слабее. Увеличение коэффициентов емкости основных дипептидов можно объяснить электростатическими взаимодействиями между анионом поверхностно-активной карбоновой кислоты и протонированной аминогруппой дипептидов. С другой стороны, электростатическое отталкивание между

нейно возрастает с увеличением длины цепи пептида. Следовательно, наклон этой прямой отражает вклад отдельного аминокислотного остатка в удерживание пептида, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, отвечает вкладу концевых групп. Путем обработки соответствующих кривых с использованием метода линейной регрессии Миик рассчитал коэффициенты удерживания остатков 20 обычных аминокислот и затем вычислил времена

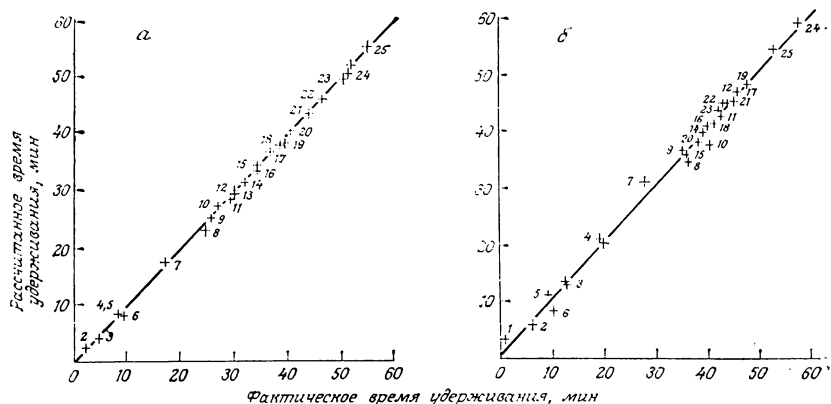


Рис. 2.8. Корреляционная зависимость между экспериментальными и расчетными величинами времени удерживания пептидов, приведенных в табл. 10.9 [161] (с разрешения авторов).

Метод разделения: ВЭЖХ; неподвижная фаза: био-рад ODS; температура: комнатная; подвижная фаза: 0,1 М NaClO₄ и ацетонитрил, линейный градиент от 0 до 60% ацетонитрила; время формирования градиента: 80 мин. а — pH 7,4 (стартовый буферный раствор содержал 5 мМ фосфата); б — pH 2,1 (стартовый буферный раствор содержал 0,1 фосфорной кислоты). Найденные значения коэффициентов корреляции: 0,996 (а) и 0,998 (б).

удерживания пептидов, которые, согласно определению, равны сумме коэффициентов удерживания аминокислотных остатков и концевых групп плюс время элюирования удерживаемых компонентов. Рис. 2.8 показывает, что расчетные величины времени удерживания практически совпадают с найденными экспериментально (коэффициент корреляции равен 0,996). Миик сравнил также полученные им величины времени удерживания с приведенными в работе О'Хара и Найса [152] (см. табл. 2.10). Чтобы внести поправку, учитывающую различия в характере градиентов и в скоростях их формирования, Миик построил корреляционную зависимость между временем удерживания олигомеров фенилаланина в использованной им системе и в системе, примененной О'Хара и Найсом. Тангенс угла наклона полученной кривой равнялся 0,836, и кривая пересекала ось ординат в точке, соответствующей —12 мин. Умножая рассчитанные выше-описанным способом величины времени удерживания пептидов:

на 0,836 и вычитая из этого произведения 12 мин, Миик получил предполагаемые величины времени удерживания, которые приведены в табл. 2.10. Принимая во внимание различие в условиях хроматографирования, использованных в работах [161] и [152] (различные колонки, различные подвижные фазы и раз-

Таблица 2.10. Сравнение вычисленных значений времени удерживания пептидов с найденными экспериментально

Соединение	Число остатков	Время удерживания, мин		Ошибка, мин
		рассчитанное [161]	фактическое ^a [152]	
[Met]энкефалин	5	18,4	19,0	—0,6
[Leu]энкефалин	5	20,9	22,0	—1,1
Фрагмент 5-10 АКТГ ^b	6	11,9	17,0	—5,1
Фрагмент 34-39 АКТГ	6	27,0	31,0	—4,0
Фрагмент 4-10 АКТГ	7	12,4	20,5	—8,1
Фрагмент 4-11 АКТГ	8	33,1	30,0	3,1
Ангиотензин 11	8	27,4	23,0	4,4
Фрагмент 4-11 вещества Р	8	33,1	30,0	3,1
Окситоцин	9	27,4	23,0	4,4
[Arg]вазопрессин	9	9,0	14,0	—5,0
[Lys]вазопрессин	9	10,2	13,0	—2,8
[Arg]вазотоцин	9	7,2	12,0	—4,8
Вещество Р	11	33,3	29,0	—4,3
α -Меланоцитстимулирующий гормон	13	27,3	26,0	1,3
Нейротензин	13	28,9	24,5	4,4
Соматостатин	14	25,5	32,0	—6,5
Бомбезин	14	22,6	26,0	—3,4
Гастрин-1	17	26,8	28,5	—1,7
Фрагмент 18-39 АКТГ	22	20,2	30,5	—10,3
Фрагмент 1-24 АКТГ	24	34,9	21,5	13,4
Мелиттин	25	61,3	46,0	15,3
Глюкагон	29	39,7	36,0	3,7
β -Эндорфин	31	41,5	34,0	7,5

^a Сорбент: гиперсил ODS; элюенты: ацетонитрил и фосфатный буфер, градиентное элюирование.

^b АКТГ — аденокортикотропный гормон.

личные режимы градиентного элюирования), следует признать, что расчетные и экспериментальные величины времени удерживания согласуются достаточно хорошо. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что предпосылки, положенные в основу метода расчета, справедливы для пептидов, содержащих вплоть до 20 аминокислотных остатков.

Для проведения биологических исследований необходимы большие (порядка грамма) количества пептидов высокой чистоты. В прошлом для очистки пептидов применяли ионообменную

и другие типы жидкостной хроматографии — методы, которые требуют значительного времени и обладают низкой эффективностью. Позднее Кульманн [142] и Габриель и др. [143] провели разделение граммовых навесок полностью защищенных пептидов методом ВЭЖХ на силикагеле. Бишоп и др. [153] применили для очистки немодифицированных пептидов метод обращен-

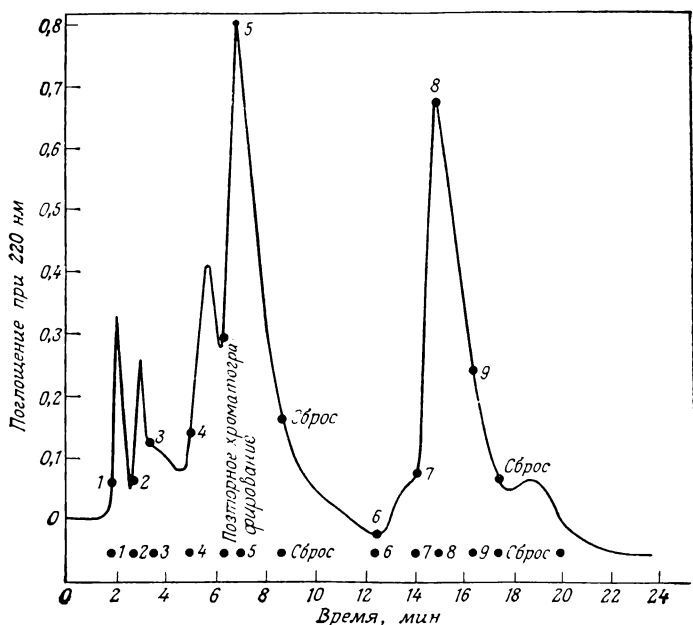


Рис. 2.9. Препаративная очистка 1 г тетрапептида $\text{Leu}(\text{Gly})_3$ методом ВЭЖХ [153] (с разрешения авторов).

Колонка: патрон $30 \times 5,7$ см; неподвижная фаза: преп. пак-500 C_{18} , размер частиц 75 мкм; подвижная фаза: вода — метанол — трифторуксусная кислота (1900 : 100 : 1); pH: 2,3; скорость потока: 100 мл/мин.

но-фазовой ВЭЖХ в полиэтиленовых патронах с октадецилсиликагелем. На рис. 2.9 приведена хроматограмма отражающая результаты очистки 1 г пептида $\text{Leu}(\text{Gly})_3$ на такой препаративной колонке. Чтобы улучшить разрешение, фракцию рехроматографировали 5 раз. Согласно данным аналитической хроматографии и аминокислотного анализа, полученные фракции 6—9 содержали только чистый тетрапептид $\text{Leu}(\text{Gly})_3$. Как выяснилось, увеличение загрузки колонки образцом, вплоть до 10 г, практически не сказывается на разрешении хроматографических пиков, а количество необратимо сорбируемых на колонке веществ не превышает 5%. На основании полученных результа-

Таблица 2.11. ВЭЖХ олигопептидов

Пептиды	Неподвижная фаза	Примечания	Литература
Защищенные пептиды	Силикагель 60	Препаративное разделение	142
Различные	Обращенная фаза	Высокое разрешение, высокий выход	147
Гекса- и гептакозапептиды	Нуклеосил C ₁₈	Ион-парная хроматография в присутствии перфторалкановых кислот	154
Соматостатин	Обращенная фаза	Качественный анализ и количественное определение	155
Дипептиды	μ -Бондапак C ₁₈	Ион-парная хроматография в присутствии алифатических кислот	156
Пептиды, содержащие от двух до пяти аминокислотных остатков	μ -Бондапак алкилфенил	Влияние катионов на время удерживания	160
Различные	Био-рад ODS	Предсказание времени удерживания	161
Ди- и трипептиды	XAD-2, XAD-4, XAD-7	Изучение удерживания и разделения	162
Различные	Обращенная фаза	—	163
Тиролиберин	Обращенная фаза	Препаративное разделение	164
Производные окситоцина, меченные ³ H ¹³ C	μ -Бондапак C ₁₈	Разделение диастереомеров	165, 166
Различные	μ -Бондапак с привитыми остатками жирных кислот	Использование ион-парных реагентов	167
Различные	Обращенная фаза	Применение в биохимии	168

Продолжение табл. 2.11

Пептиды	Неподвижная фаза	Примечания	Литература
Дипептиды	Фаза с привитым трипептидом L-Val—L-Ala—L-Pro	Разделение диастереомеров	169
Ди- и трипептиды	Фаза типа C ₈	Влияние pH и ионной силы на разделение	170
Пептиды, содержащие от двух до десяти аминокислотных остатков	μ-Бондапак C ₁₈	Использована подвижная фаза, содержащая фосфорную кислоту	171
Пептиды, содержащие от двух до пяти аминокислотных остатков	μ-Бондапак алкилфенил	Использованы гидрофобные ион-парные реагенты	172
Инсулин, глюкагон, соматостатин	Гранулированная гликофаза G/CPG-100	—	173
Смеси пептидов	μ-Бондапак с привитыми остатками жирных кислот	Составление пептидных карт	174
Триптические пептиды	μ-Бондапак C ₁₈	—	175
Пептидные гормоны	Силикагель с привитыми октадецильными и триметилсилильными остатками	Ион-парная хроматография в присутствии алифатических кислот	176
Белковый гидролизат	Микропак AX-10	—	177
Pro—Leu—Gly—NH ₂	μ-Бондапак C ₁₈	Выделение пептида, меченного тритием	178

тов авторы пришли к выводу, что в принципе возможна быстрая и эффективная очистка немодифицированных пептидов в количестве до 10 г с хорошим выходом.

В табл. 2.11 приведены сведения о некоторых опубликованных в период с 1978 по 1980 г. работах, касающихся ВЭЖХ пептидов.

2.4. Газовая хроматография

В последнее десятилетие газовая хроматография приобрела большое значение в качестве альтернативы методу ионообменной хроматографии. К преимуществам газовой хроматографии относятся:

а) высокая чувствительность (при использовании пламенно-ионизационного детектора предел обнаружения вещества составляет 1 пмоль, а если детектором служит масс-спектрометр, предел обнаружения составляет менее 1 пмоль);

б) более низкая стоимость оборудования по сравнению со стандартной автоматической системой для ионообменной хроматографии;

в) высокая скорость анализа;

г) возможность выбора способа обнаружения (пламенно-ионизационный, азотный или фосфорный детектор, электронозахватный детектор и масс-спектрометр);

д) возможность использования газового хроматографа во многих других аналитических методах.

В то же время наличие в молекулах аминокислот и пептидов таких различных функциональных групп, как карбоксильная, сульфгидрильная, имидазольная, гуанидиновая, индольная, аминок-, имино- и оксигруппа, весьма затрудняет разработку единой универсальной методики, обеспечивающей воспроизводимое, количественное и одновременное превращение всех аминокислот в летучие и стабильные производные, пригодные для разделения методом газовой хроматографии. Перечисленным требованиям не удовлетворяет ни одна из разработанных к настоящему времени методик. Таким образом, газовая хроматография не является рутинным методом определения аминокислот и пептидов, хотя она представляет собой чрезвычайно полезный и чувствительный метод специального анализа. С помощью этого метода — особенно в сочетании с масс-спектрометрией и методами, основанными на использовании стабильных изотопов, — можно, например, следить за превращениями определенного числа аминокислот, изучать пути их метаболизма, разделять оптические изомеры. Эти области применения газовой хроматографии рассмотрены в обзорах [179—181] и [2, 182].

2.4.1. Газовая хроматография аминокислот

2.4.1.1. Очистка препаратов

Поскольку наиболее широко используемый пламенно-ионизационный детектор неселективен, биологические образцы перед их превращением в соответствующие производные необходимо очищать. Метод Поклингтона [183], первоначально предназначенный для определения аминокислот в морской воде, применим и для анализа многих биологических препаратов. С целью получения большой поверхности образец лиофилизируют и в виде суспензии в сухом диэтиловом эфире наносят на колонку (400××25 мм) с дауэксом 50W-X12 (100—200 меш) в H⁺-форме. Далее аминокислоты экстрагируют в виде гидрохлоридов водным этанолом, подкисленным до pH 1,3 путем добавления HCl. Экстракт высушивают в вакууме, остаток растворяют в воде, полученный раствор, если необходимо, промывают хлороформом с тем, чтобы удалить мешающие анализу пигменты и карбоновые кислоты. После этого смесь очищают методом катионообменной хроматографии; наносят на колонку с сульфополистиролом и элюируют 2 М раствором гидроксида аммония.

Чтобы удалить белок из плазмы крови, к последней добавляют пикрат [184] или лучше (чтобы избежать потери основных аминокислот) сульфосалициловую кислоту [185], смесь фильтруют, не содержащий белков фильтрат очищают методом катионообменной хроматографии на колонке (50×8 мм) с дауэксом AG50W-X8. Методики очистки образцов мочи перед разделением и количественным определением в нем аминокислот и пептидов описаны в работах [2, 182].

2.4.1.2. Получение производных

Из-за одновременного наличия в молекулах аминокислот карбоксильной и аминогруппы эти соединения отличаются малой летучестью, и чтобы образец был пригоден для газохроматографического анализа, необходимо модифицировать указанные функциональные группы. Метод получения производных должен быть таким, чтобы превращение полярных групп не сопровождалось разрушением структуры молекулы*. В 1956 г.

* Получение производных и газовая хроматография аминокислот рассмотрены в книге: Сунозова Е. В., Трубников В. И., Сакодинский К. И. Газовая хроматография аминокислот. — М.: Наука, 1976. Общие вопросы получения производных для газохроматографического анализа обсуждаются в книге: Березкин В. Г. Химические методы в газовой хроматографии. — М.: Химия, 1980 и Berezkin V. G., Chemical Methods in Gas Chromatography, Amsterdam, Elsevier, 1983 (расширенное и дополненное издание). — Прим. ред.

Хантер и др. [186] предложили метод газохроматографического анализа, основанный на определении альдегидов, образующихся при взаимодействии аминокислот с нингидрином. Эти альдегиды можно также получить и с помощью других реагентов. Аминокислоты можно также хроматографировать в виде аминспиртов, аминов, нитрилов и т. д. [181]. Наиболее подходящими для газохроматографического анализа являются, однако, такие производные, в которых сохранены все функциональные группы, но их полярность уменьшена в результате модификации. В литературе описано большое число таких производных, а подробные методики их получения даны в превосходном руководстве Кнаппа [187]. В настоящее время наиболее часто используются триметилсилильные производные и сложные эфиры ациламинокислот.

2.4.1.3. Триметилсилильные производные

За первым сообщением об изучении триметилсилильных производных аминокислот, появившимся в 1960 г. [188], последовало их систематическое исследование [189, 190]. Трудности, с которыми приходится сталкиваться при получении этих производных, обусловлены в основном низкой реакционной способностью аминокрупп и нестабильностью образующихся триметилсилазанов, которые весьма чувствительны к следовым количествам воды. Согласно данным Герке и сотр. [191, 192], воду лучше всего удалять в несколько приемов путем ее азеотропной отгонки с дихлорметаном. Сложность превращения аминокрупп в силильные производные, в результате которого образуется набор продуктов, стимулировала изучение действия разнообразных силилирующих агентов в различных условиях. Установлено, что в зависимости от условий реакции некоторые аминокислоты, а именно глицин, ω -аминокислоты, аргинин, гистидин и триптофан, дают на хроматограммах двойные пики [189, 190, 192]. Глутаминовая кислота может образовать 2-пирролидон-5-карбовую кислоту. Хранение триметилсилильных производных аминокислот в присутствии силилирующих агентов в плотно закрытой посуде должно было бы обеспечить их устойчивость по меньшей мере в течение недели [191, 192], однако известно, что концентрация производных гистидина существенно уменьшается уже через 2 ч [194], а аргинин, γ -аминоаслянную кислоту, цитруллин, глутамин, гистидин, сульфоксид метионина и таурин вообще невозможно превратить в стабильные производные [183]. Поэтому, как показывает наш опыт, триметилсилильные соединения следует хроматографировать непосредственно после охлаждения реакционной смеси.

Краткое описание нескольких различных методов триметилсилилирования приведено в табл. 2.12, а подробно все эти ме-

Таблица 2.12. Методы получения триметилсилильных производных аминокислот

Аминокислоты	Реагент ^a	Температура, °C	Время	Литература
Любые	BSTFA—MeCN	150	2,5 ч	192 ⁷
Любые	BSTFA—MeCN	125	15 мин	194 ⁷
Любые	BSA—TMCS—Py	60	12—14 ч	195 ⁷
Любые	TMSDEA	Кипячение	1 ч	196
Любые	MSA	25 или 60—100	5 мин	197
Любые	MSTFA—CF ₃ COOH	25	До растворения	198
Любые	MSTFA—TMCS—MeCN	120	1 ч	199
Серусодержащие	BSTFA	150	5 мин	200
Глицин, лизин, аргинин	BSTFA—MeCN	135	15 мин	190, 201
Триптофан,	1. CH ₂ O—NaOH	40	15 ч	202
триптамыны	2. BSTFA	25		
3-Метилгистидин	BSTFA—MeCN	150	2,5 ч	203
Глутаминовая кислота	BSTFA	—	—	204

^a BSTFA — бис(триметилсилил)трифторацетамид, BSA — бис(триметилсилил)ацетамид, TMCS — триметилхлорсилан, TMSDEA — триметилсилилдиэтиламин, MSA — N-метил-N-триметилсилацетамид, MSTFA — N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид.

тоды описаны в руководстве Кнаппа [187]. По-видимому, наибольшее распространение получил метод получения триметилсилиловых эфиров, предложенный Герке и сотр. [191, 192].

Водный раствор, содержащий 0,5—6 мг аминокислот, упаривают в силинизированной пробирке в токе азота при 70 °C. Следы воды удаляют азеотропной отгонкой с дихлорметаном (2×0,5 мл), затем добавляют 250 мкл ацетонитрила, содержащего внутренние стандарты, и 250 мкл бис(триметилсилил)ацетамида на 1 мг каждой аминокислоты. Пробирку закрывают заворачивающейся пробкой, снабженной прокладкой из политетрафторэтилена, озвучивают 1 мин, выдерживают 2,5 ч при 150 °C, охлаждают и смесь хроматографируют. Если методика в точности выполнена, на хроматограмме, полученной при равных весовых количествах стандартов, площади пиков, отвечающих ди- и три(триметилсилил)глицину, должны относиться как 1:15, а для соответствующих производных глутаминовой кислоты указанное отношение должно быть равно 10, смесь должна содержать только тетрапроизводные лизина, причем площадь соответствующего пика должна быть примерно вдвое больше площади пика, отвечающего тетра(триметилсилил)аргинину.

Для газохроматографического разделения триметилсилильных производных используют только неполярные жидкие фазы. Чтобы предотвратить разложение образцов в инжекторе, их лучше всего вводить непосредственно в колонку. В табл. 2.13 приведены выраженные в метиленовых единицах (МЕ) значения относительной подвижности триметилсилильных производных аминокислот на двух колонках с различными подвижными фа-

Таблица 2.13. Относительная хроматографическая подвижность
триметилсилильных производных аминокислот,
выраженная в метиленовых единицах (ME)^a

Аминокислота	ME _{OV-17}	ME _{OV-1}	ΔME
N-Ацетилфенилаланин	19,33	17,90	1,43
N-Ацетилтриптофан ^b	26,00	24,18	1,82
Аланин	11,25	11,05	0,20
β-Аланин	12,30	11,90	0,40
α-Аминомасляная кислота	12,00	11,77	0,23
γ-Аминомасляная кислота	15,57	15,46	0,11
α-Аминоизомасляная кислота	11,60	11,48	0,12
β-Аминоизомасляная кислота	12,48	12,16	0,32
	14,76	14,74	0,02
Аргинин ^a	16,40	16,32	0,08
Аспарагин ^a	18,00	16,87	1,13
Аспарагиновая кислота	15,88	15,41	0,47
Цитруллин	19,03	18,36	0,67
Цистатионин	22,84	22,35	0,49
Цистеиновая кислота ^a	20,67	19,69	0,98
Цистеин	16,19	15,65	0,54
Цистин	23,95	23,12	0,83
3,4-Диоксифенилаланин	21,63	21,24	0,39
1,4-Диметилгистидин	19,59	17,35	2,24
Дьенколевая кислота	25,60	24,58	1,02
Глутаминовая кислота	16,89	16,29	0,60
Глутамин ^a	18,87	17,73	1,14
Глицин	11,52	11,11	0,41
	13,21	13,18	0,03
Гистидин	20,98	19,14	1,84
		18,00	
Гомоцистин	26,38	25,63	0,75
4-Оксилизин	18,55	18,90	—0,35
	20,58	21,19	—0,61
4-Оксипролин	15,63	15,46	0,17
5-Окситриптофан	26,01	24,60	1,41
Изолейцин	13,14	13,06	0,08
Кинуренин	23,57	21,86	1,71
Лантионин	21,57	21,33	0,24
Лейцин	12,91	12,84	0,07
Лизин	19,26	19,56	—0,30
Метионин	16,17	15,30	0,87
1-Метилгистидин	21,06	17,64	3,42
3-Метилгистидин	20,40	17,24	3,16
Орнитин	18,21	18,53	—0,32
Фенилаланин	17,24	16,25	0,99

Продолжение таблицы 2.13

Аминокислота	ME _{OV-17}	ME _{CV-1}	ΔME
Пипеколиновая кислота	14,07	13,67	0,40
Пролин	13,50	13,02	0,48
Саркозин	11,73	11,43	0,30
Серин	14,10	13,80	0,30
2-Тиогистидин	23,85	22,51	1,34
Треонин	13,97	14,04	—0,07
Триптофан	23,77	22,15	1,62
Тирозин	20,19	19,52	0,67
Валин	12,44	12,34	0,10

^a Колонка: пирекс, 1,8 м×6,35 мм; неподвижная фаза: 3% OV-1 или OV-17 на хромосорбе WHP, размер частиц 80—100 меш; газ-носитель: гелий, скорость потока: 80 мл/мин; температура: программное увеличение от 100 до 325 °C со скоростью 10 °C/мин; для соединений с ME < 12,0 начальная температура 70 °C [201].

^b Вторичный пик на обеих колонках.

^в Вторичный пик на колонке с OV-17.

зами: 3% OV-1 или 3% OV-17 на хромосорбе WHP. Как показывают полученные данные, соединения, в молекулах которых имеется система делокализованных π-электронов, сильнее удерживаются на фазе OV-17, содержащей фенильные остатки. Об этом, в частности, говорят величины приведенной в таблице ΔME (ΔME = ME_{OV-17} — ME_{OV-1}). Высокие значения ΔME характерны для ароматических аминокислот — гистидина, кинуренина, фенилаланина, тирозина и триптофана, а также для амидов и карбамидов — аспарагина, глутамина и цитруллина. В то же время для алифатических аминокислот и аминокислот, содержащих гидроксильную или дополнительную аминогруппу, получены низкие значения ΔME. Дизамещенные по аминогруппе соединения удерживаются значительно сильнее, чем монопроизводные, из-за их более высокой молекулярной массы (ср., например, β-аланин, β-аминоизомасляную кислоту, глицин и 4-оксилизин в табл. 2.13). Вместе с тем увеличение эффективности экранирования аминогруппы, обусловленное наличием двух триметилсилильных остатков, сопряжено с уменьшением величины ΔME. По этой же причине треонин, в молекуле которого содержится более экранированная вторичная гидроксильная группа, характеризуется более низким значением ΔME, чем серин, в молекуле которого имеется первичная гидроксильная группа. Введение гидроксильных групп в молекулу аминокислоты приводит к увеличению молекулярной массы триметилсилильных производных и, следовательно, их индексов удерживания, однако величина

ΔМЕ при этом уменьшается (ср. фенилаланин, тирозин и 3,4-диоксифенилаланин, пролин и 4-оксипролин).

Герке и сотр. [191] использовали смесь OV-7 и OV-22 (2:1), которую позднее заменили на фазу OV-11, содержащую примерно такое же количество метил- и фенилсиликона (65% метилсиликона и 35% фенилсиликона) [192]. На рис. 2.10 в качестве

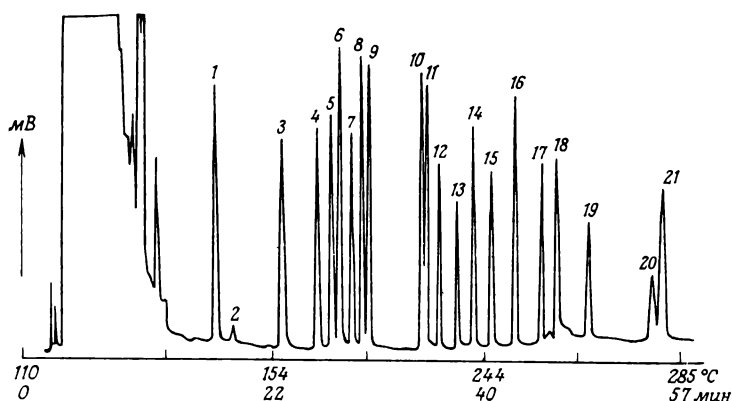


Рис. 2.10. Разделение смеси триметилсилильных производных аминокислот методом газовой хроматографии [191] (с разрешения авторов).

Колонка: 6 м×2 мм; неподвижная фаза: 10% OV-11 на супелкопорте, размер частиц 100—120 меш; газ-носитель: азот; скорость потока: 20 мл/мин; начальная температура: 110 °C; программированное увеличение температуры до 154 °C со скоростью 2 °C/мин, затем до 285 °C со скоростью 5 °C/мин; температура инжектора: 275 °C; температура детектора: 300 °C. Идентифицированы следующие соединения: 1 — аланин; 2 — биглицин; 3 — валин; 4 — лейцин; 5 — изолейцин; 6 — триглицин; 7 — пролин; 8 — серин; 9 — треонин; 10 — оксипролин; 11 — аспарагиновая кислота; 12 — метионин; 13 — глутаминовая кислота; 14 — фенилаланин; 15 — аргинин; 16 — лизин; 17 — тирозин; 18 — гистидин; 19 — внутренний стандарт; 20 — триптофан; 21 — цистин.

примера приведена хроматограмма гидролизата белка. Из-за большой длины использованной колонки (6 м при внутреннем диаметре 2 мм) количественно элюировать производные гистидина не удастся. Разделение производных метионина, глутаминовой кислоты, фенилаланина, аргинина, лизина, тирозина, гистидина, триптофана и цистина рекомендуется проводить на более короткой колонке (2 м при внутреннем диаметре 4 мм) при программировании температуры (5 мин при 190 °C, затем увеличение температуры до 265 °C со скоростью 5 °C/мин).

2.4.1.4. Эфиры ациламинокислот

Многие методики получения производных аминокислот включают этерификацию карбоксильных групп. Хотя сами по себе эфиры некоторых аминокислот достаточно летучи и их можно

непосредственно анализировать методом газовой хроматографии [205], наибольшее распространение получила методика анализа производных аминокислот, полученных в результате этерификации карбоксильной группы и ацилирования аминокислот. Этерификацию, как правило, проводят в абсолютном спирте, содержащем каталитические количества сильной кислоты, чаще всего HCl [206]. В этих же целях можно также использовать тионилхлорид [207], диметилсульфит [208] и кислые ионообменные смолы. Недостаток диазометана как метилирующего реагента заключается в том, что удаление его избытка путем упаривания сопровождается потерей продуктов реакции вследствие очень высокой летучести метиловых эфиров некоторых аминокислот. Поэтому были изучены эфиры высших спиртов — пропилового, бутилового и аллилового (см. [187], с. 263). Поскольку аминокислоты нерастворимы в высших спиртах, сначала получают их метиловые эфиры, которые затем путем реакции перэтерификации превращают в эфиры высших спиртов. Эфиры обычно ацилируют ангидридами кислот в дихлорметане, этилацетате или ацетонитриле. Следует подчеркнуть, что этерификация всегда должна предшествовать ацилированию, поскольку O - и N -ацилпроизводные неустойчивы в условиях этерификации. Влияние заместителей на характеристики удерживания эфиров N -ациламинокислот изучено в работах [209, 210]. Установлено, что наиболее подходящими для газохроматографического анализа являются ацетил-, пропионил- и трифторацетилпроизводные этилового, пропилового и бутилового эфиров аминокислот. Фторированные производные особенно удобны при использовании детектора по захвату электронов и масс-спектрометрического метода химической ионизации отрицательными ионами. Согласно данным работы [211], детектор по захвату электронов позволяет обнаружить производные цистеина и метионина в количестве соответственно 2 и 1 пг. В последние годы наибольшее распространение получили производные N -трифторацетил- n -бутилового эфира, впервые введенные в аналитическую практику Герке [212]. При получении n -бутиловых эфиров отпадает необходимость перэтерификации, поскольку аминокислоты можно превратить в указанные эфиры непосредственно путем их взаимодействия со спиртами. Для этерификации всех аминокислот, за исключением изолейцина, достаточно 15-минутного нагревания смеси, содержащей 3 М HCl , при 100 °С. Этерификация изолейцина заканчивается через 35 мин [213].

С помощью силилирования бутиловых эфиров аминокислот установлено, что этерификация протекает не с количественным выходом [214]. Последующее изучение реакции показало, что 15-минутное нагревание бутанола, содержащего 2,7 М HCl , при 150 или 100 °С приводит к образованию соответственно более

2 и 0,2 моля воды. Такого количества воды достаточно для того, чтобы существенно сдвинуть равновесие в сторону исходной аминокислоты.

Трифторацетильные производные бутиловых эфиров аминокислот получают по следующей методике [213]. Раствор образца, содержащий внутренний стандарт, упаривают досуха в реакционной микропробирке в токе азота при 100 °С. На 100 мкг аминокислот добавляют 150 мкл 3 М HCl в *n*-бутаноле. Смесь озвучивают не менее 15 с, выдерживают 15 мин при 100 °С и далее упаривают при 100 °С в токе азота. Следы воды удаляют азеотропной отгонкой с дихлорметаном (150 мкл). К сухому остатку добавляют дихлорметан и ангидрид трифторуксусной кислоты из расчета 60 мкл растворителя и 20 мкл реагента на 100 мкг аминокислот. Реакционный сосуд закрывают завинчивающейся пробкой, снабженной прокладкой из политетрафторэтилена, и нагревают 5 мин при 150 °С. Непосредственно после охлаждения смесь хроматографируют. В работе [215] описана методика одновременного блокирования карбоксильных и фенольных групп обработкой смесью фторированного спирта и фторированного ангидрида жирной кислоты. Авторы работы [216] предложили одностадийную модификацию глутаминовой и γ -аминомасляной кислот с использованием пентафторпропионового ангидрида и гексафторпропанола. В нашей лаборатории производные как аминокислот, так и олигопептидов получают, нагревая образцы 20 мин при 100 °С в смеси трифторуксусной кислоты и трифторэтанола [217].

В 1961 г. Джонсон и др. [218] описали разделение *N*-ацетил-*n*-амиловых эфиров 35 аминокислот методом газовой хроматографии на полиэтиленгликолевой фазе. Однако этот метод нельзя рекомендовать для определения аминокислот, поскольку *N*-ацетильным производным на хроматограмме отвечают широкие пики. Впоследствии было предпринято интенсивное изучение разнообразных полярных и неполярных фаз [219—225] с целью выявить оптимальные условия разделения. Как выяснилось, наилучшего разделения смеси производных 20 обычных аминокислот, входящих в состав белков, можно достичь, используя систему из двух колонок, введенную в аналитическую практику Герке и др. [226]. На первой колонке, содержащей 0,65% адипината этиленгликоля на хромосорбе W, разделяются все соединения, за исключением производных гистидина, цистеина и аргинина. Разделение этих производных проводят на смешанной фазе: 10% OV-210 и 2% OV-17 (по массе) на газохроме Q.

Поскольку трифторацетильные производные менее стабильны, чем, например, ацетильные, и поскольку на колонке может проходить разложение *O*- и *S*-трифторацетилированных соединений, для их разделения следует использовать только неполяр-

Таблица 2.14. Разделение производных аминокислот методом газовой хроматографии

Производные	Неподвижная фаза	Температура, °С	Примечания	Литература
Гептафторбутирил- <i>n</i> -пропиловые эфиры	1% OV-1 или 3% SE-30	80—250	Аминокислотный анализ химо-трипсиногена А и казеина	228
N-Ацетил- <i>n</i> -пропиловые эфиры	0,31% карбовакса 20М, 0,28% силара-5СР и 0,06% лексана	100—250	Определение аминокислот в эритроцитах	229
N-Трифторацетил- <i>n</i> -бутиловые эфиры	Табсорб и табсорб НАС (две колонки)	100—200 100—210	Определение аминокислот в соеновой хвое	230
N(O,S)-Гептафторбутириллизобутиловые эфиры	3% SE-30	100—250	Контроль полноты модификации	231, 232
Эфиры N-ациламиннокислот	3% OV-17	90—230	Определение аминокислот в тканях крыс	233
N-Гептафторбутирил- <i>втор</i> -пропиловые эфиры	3% SE-30	75—250	Определение гомосерина	234
N-Трифторацетил- <i>n</i> -бутиловые эфиры	3% QF-1—1% SE-30 (3:2, по массе)	90—250	Аминокислотный анализ коллагена в тканях, взятых на биопсию	235

ные фазы. Особенно быстро теряет один ацильный остаток диацильное производное гистидина. Чтобы предотвратить эту реакцию, одновременно с образцом в колонку вводят соответствующий ангидрид [224, 227]. Если раствор образца содержит низшие спирты, присутствие гептафтормасляной кислоты может привести к нежелательному образованию «хвостов» у хромото-

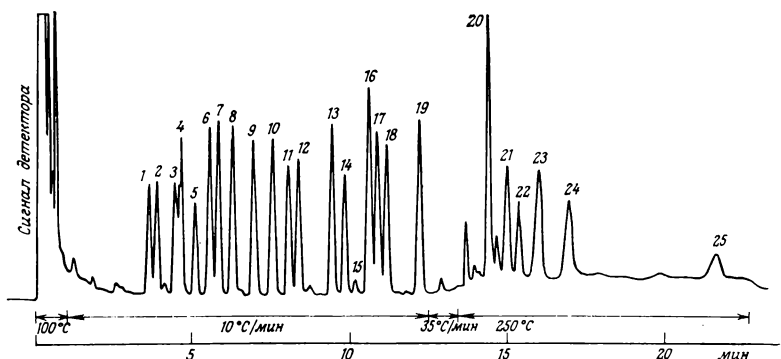


Рис. 2.11. Разделение смеси *N*-ацетил-*n*-пропиловых эфиров аминокислот методом газовой хроматографии [229] (с разрешения авторов).

Колонка: стеклянная, 76×0,6 см (внутр. диаметр 2 мм); неподвижная фаза: 0,31% карбовакса 20 М, 0,28% силара-5СР и 0,06% лексана на хромосорбе WAW, размер частиц 120—140 меш; газ-носитель: гелий; скорость потока: 25 мл/мин; программирование температуры: 1 мин при 100°C, подъем температуры до 215°C со скоростью 10°C/мин, быстрое увеличение температуры до 250°C и изотермический режим в течение 10 мин; температура инжектора: 250°C; температура детектора: 275°C. Каждому пику на хроматограмме отвечает 5 нмоль производного следующих аминокислот: 1 — 2-аминоизомасляной кислоты; 2 — аланина; 3 — 2-аминомасляной кислоты; 4 — валина; 5 — глицина; 6 — изолейцина; 7 — лейцина; 8 — норлейцина (внутренний стандарт); 9 — пролина; 10 — треонина; 11 — 4-аминомасляной кислоты; 12 — серина; 13 — аспарагина; 14 — метионина; 15 — цистеина; 16 — фенилаланина; 17 — оксипролина; 18 — глутамина; 19 — 2-аминоадипиновой кислоты; 20 — тирозина; 21 — орнитина; 22 — гистидина; 23 — лизина; 24 — аргинина; 25 — триптофана.

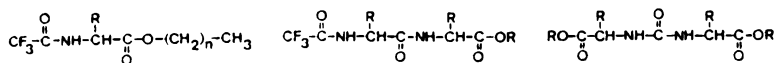
графических пиков. В этом случае, а также при введении больших количеств раствора образца (около 100 мкл) качество разделения можно повысить с помощью предложенного Цумвальтом и др. [211] «клапана для растворителя». Это приспособление препятствует прониканию растворителей и реагентов в хроматографическую колонку, позволяет концентрировать растворы образцов перед анализом, а также сводит к минимуму потери компонентов смеси в ходе этой стадии. Ссылки на ряд работ, посвященных получению производных аминокислот и использованию различных фаз для их газохроматографического анализа, приведены в табл. 2.14. На рис. 2.11 показана недавно опубликованная хроматограмма, полученная при разделении смеси производных аминокислот на смешанной полярной фазе [229].

2.4.1.5. Разделение энантиомеров

Хроматография оптических изомеров (особенно энантиомеров) представляет особый интерес как метод определения степени рацемизации аминокислот в ходе пептидного синтеза и анализа природных пептидов, содержащих остатки D-аминокислот. Для газохроматографического разделения таких изомеров либо используют оптически активную неподвижную фазу, либо в молекулы анализируемых производных вводят второй асимметрический центр и получают таким образом пары диастереомеров.

2.4.1.5.1. Разделение на оптически активных неподвижных фазах

Разделение энантиомеров на хиральной фазе теоретически возможно, однако осуществить его на практике можно только в том случае, если различие во времени удерживания изомеров достаточно велико, поскольку лишь при таком условии длину колонки можно уменьшить до разумных размеров. В 1966 г. Гил-Ав и др. [236, 237] сообщили о первом успешном разделении энантиомеров. Они хроматографировали ряд эфиров N-трифторацетиламинокислот на стометровой стеклянной капиллярной колонке, содержащей в качестве неподвижной фазы циклогексильный эфир L-(N-трифторацетил)валил-L-валина. Им удалось также достаточно хорошо разделить энантиомеры *трет*-бутилового эфира N-трифторацетилаланина на колонке длиной 2 м [238]. Последующая работа выполнена в основном на фазах трех типов:



эфиры трифторацетиламинокислот

эфиры трифторацетилдипептидов

эфиры карбонилбисаминокислот

Применение дипептидных фаз оказалось особенно успешным при разделении энантиомеров α-аминокислот, в том числе циклогексильных эфиров следующих N-трифторацетилпроизводных дипептидов: L-Val—L-Val [222, 238—241], L-Phe—L-Leu [221, 222, 242, 243], L-Val—L-Leu [224], L-Leu—L-Val [245], L-Nle—L-Nle [246], Nva—L-Nva [246, 247], L-Abu—L-Abu [246]. Изучение влияния структуры неподвижной фазы и разделяемых энантиомеров на относительное время удерживания последних позволило разработать «трехточечную» модель взаимодействия оптических изомеров с фазой. Согласно этой модели, впервые постулированной Гил-Авом и Фейбушом [238], энан-

тиомеры образуют водородные связи с молекулами хиральной неподвижной фазы. Такие комплексы должны представлять собой конформационные стереоизомеры, и поэтому физические свойства D—L- и L—L-комплексов должны различаться. Однако результаты спектральных исследований, а именно данные ЯМР ^1H и ^{13}C , поставили под сомнение обоснованность этой модели. Лочмюллер и сотр. [248, 249] обращают внимание, что

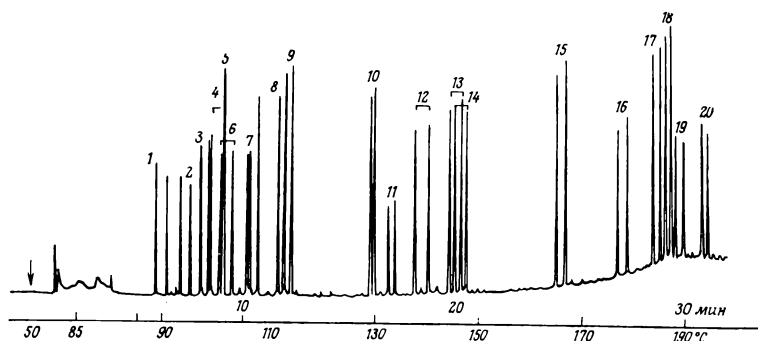


Рис. 2.12. Разделение энантиомеров изопропиловых эфиров *N*-пентафторпропионилпроизводных аминокислот методом газовой хроматографии [252] (с разрешения авторов).

Колонка: стеклянная капиллярная, 20 м×0,28 мм; неподвижная фаза: хирасил-Val; газ-носитель: водород, избыточное давление 38 кПа; программирование температуры: начальная температура 35 °С, быстрое увеличение до 82 °С, изотермический режим в течение 4 мин, подъем температуры до 195 °С со скоростью 4 °С/мин и изотермический режим в течение 20 мин; температура инжектора и детектора: 250 °С. Идентифицированы следующие соединения: 1 — аланин; 2 — валин; 3 — треонин; 4 — α-изолейцин; 5 — глицин; 6 — изолейцин; 7 — пролин; 8 — лейцин; 9 — серин; 10 — аспарагиновая кислота; 11 — цистеин; 12 — метионин; 13 — фенилаланин; 14 — глутаминовая кислота; 15 — тирозин; 16 — орнитин; 17 — лизин; 18 — *N*-этоксикарбонилгистидин (модификация по атому азота имидазольного кольца); 19 — аргинин; 20 — триптофан.

важным фактором, определяющим геометрию молекулы вокруг участка связывания, является более высокая по сравнению с ординарной кратность амидной связи. К тому же получено убедительное свидетельство того, что карбонильный атом кислорода пептидной группы находится скорее всего в *транс*-положении по отношению к амидному атому водорода. Поэтому существование многих из предложенных «трехточечных» структур весьма маловероятно или даже вообще невозможно. Спектральные данные [248] указывают на то, что существует лишь один ответственный за образование диастереомерного комплекса участок взаимодействия, а именно только амидная NH-группа может образовать водородную связь с карбонилем сложноэфирной группы неподвижной фазы [247].

Большинство работ в этой области выполнено с использованием жидких фаз со сравнительно низкой молекулярной мас-

сой. Такие фазы обладают следующими недостатками: они вымываются из колонки, склонны к разложению и весьма неустойчивы при высоких температурах. Франк и др. [250] проводили разделение на полисиликоне с привитыми N-пропионил-L-валил-трет-бутиламидными остатками. На этой фазе, лишенной указанных недостатков, авторам [250] удалось разделить большую часть энантиомеров аминокислот, входящих в состав белков,

Таблица 2.15. Отнесение хроматографических пиков
(см. рис. 2.13)

Номер пика	Дипептид	Номер пика	Дипептид	Номер пика	Дипептид
1	Gly—Gly	18	Gly—L-Ser	35	L-Ser—L-Met
2	L-Val—Gly	19	L-Ala—L-Asn	36	Gly—L-Met
3	Gly—L-Leu	20	Gly—L-Thr	37	L-Phe—L-Val
4	L-Leu—Gly	21	Gly—L-Phe	38	L-Val—L-Phe
4	L-Ala—L-Ala		L-Phe—Gly	39	DL-Leu—DL-Phe
5	Gly—L-Ser	22	Gly—L-Glu	40	Gly—L-Glu
6	Gly—L-Thr	23	Gly—L-Val	41	DL-Leu—DL-Phe
7	L-Ala—L-Val		L-Leu—L-Leu	42	L-Ser—L-Phe
8	L-Ala—L-Leu	24	Gly—L-Leu	43	Gly—L-Phe
9	L-Ala—L-Ile	25	L-Ala—L-Asp	44	L-His—L-Ala
	L-Leu—L-Ala	26	Gly—L-Ile	45	L-Ala—L-His
10	α -L-Asp—Gly		L-Ala—L-Asn	46	L-Met—L-Met
11	Gly—L-Met	27	L-Leu—L-Ser	47	L-Ala—L-Tyr
	L-Met—Gly	28	L-Ala—L-Met	48	L-Tyr—L-Ala
12	Gly—L-Asp	29	L-Met—L-Ala	49	L-Tyr—Gly
13	Gly—L-Ile	30	L-Ala—L-Glu	50	L-Trp—Gly
14	L-Val—L-Val	31	L-Phe—L-Ala	51	L-Met—L-Phe
	L-Ser—L-Ala	32	L-Ala—L-Phe	52	L-His—L-Ser
15	DL-Ala—DL-Ser	33	γ -L-Glu—L-Leu	53	Gly—L-His
16	DL-Ala—DL-Ser	34	Gly—L-Asp	54	L-Phe—L-Phe
17	L-Ala—L-Thr		L-His—Gly	55	L-Trp—L-Ala

при температуре от 70 до 240 °C. Они также разработали метод аминокислотного анализа, названный «энантиомерное мечение» [251, 252]. На рис. 2.12 приведена хроматограмма смеси энантиомеров 20 аминокислот. Соответствующие D-аминокислоты были добавлены к образцу сыворотки до стадии очистки и использованы в качестве внутренних стандартов.

2.4.1.5.2. Разделение диастереомеров

Разделить энантиомеры аминокислот в виде диастереомеров впервые удалось Вейганду и др. [253]. Сначала эти авторы изучали разделение метиловых эфиров N-трифторацетилпроизводных дипептидов L-Ala—L-Phe и L-Ala—D-Phe на двухметровой насадочной колонке с силиконовой неподвижной фазой,

а затем разделение пар диастереомеров ряда таких же производных дипептидов на капиллярных колонках [254, 255]. На использованных неподвижных фазах время удерживания LD- и DL-изомеров, как правило, больше, чем LL- и DD-изомеров [256, 257], и полярные фазы типа карбовакса предпочтительнее неполярных [258, 259]. Сближенность двух асимметрических центров в молекулах диастереомеров благоприятствует разрешению хроматографических пиков. Так, например, самые лучшие результаты были получены при разделении эфиров N-трифторацетиламинокислот и 3,3-диметилбутанола-2 [259—261], бутанола-2 [257, 258, 261—271] и октанола-2 [263], а также метиловых эфиров N-трифторацетил-L-пролиламинокислот [259, 272—274]. Вейганд и др. [275] изучали разделение D- и L-аминокислот в виде дипептидов, содержащих вместо остатка пролина остатки аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина или фенилаланина. Дополнительную информацию можно почерпнуть в обзоре Колба [276], написанном еще в 1971 г., но до сих пор не утратившем своей актуальности.

Вестли и др. [259] провели систематическое исследование влияния структуры диастереомеров эфиров и амидов аминокислот на их разделение. В работе [261] описана методика газохроматографического анализа плохо поддающихся разделению рацематов аспарагиновой кислоты, триптофана и аминокислот, содержащих гидроксильную или сульфгидрильную группу. Эта же методика была использована для определения аминокислот в метеоритах [268, 269, 272], для оценки оптической чистоты меченных ^{14}C аминокислот [277], а также для установления конфигурации алло-изолейцина, присутствующего в плазме крови больных кетоацидозом [270]. В работе [278] описано разделение аминокислот в виде их 3,3-диметил-2-бутиловых эфиров на насадочных колонках. Оптическая чистота 14 полученных диастереомеров соответствовала 93% и более; исключение составили лишь аспарагиновая кислота и пролин, оптическая чистота которых составляла соответственно 70 и 82%.

2.4.2. Газовая хроматография пептидов

Пептиды, подобно аминокислотам, обладают высокой полярностью и низкой летучестью, и поэтому методом газовой хроматографии их можно разделить только в виде соответствующих производных. Поскольку собственно газовой хроматографии пептидов посвящено лишь несколько работ, причем основное внимание в них уделено масс-спектрометрии и хроматомасс-спектрометрии, этот метод более подробно обсуждается в разд. 2.5.1.2, а здесь мы ограничимся описанием производных дипептидов и рассмотрим некоторые проблемы, связанные с их разделением.

2.4.2.1. Производные пептидов

Работа Вейганда и др. [253] положила начало широкому использованию газовой хроматографии для анализа пептидов в виде их N-трифторацетилованных метиловых [254, 255, 272, 279—285] или бутиловых [286] эфиров. Если пептиды разделяют в виде их N-пентафторпропионилпентафторпропиловых эфиров, то для их обнаружения можно применять очень чувствительный детектор по захвату электронов. Преимущество метиловых эфиров N-пентафторбутилпептидов по сравнению с соответствующими трифторацетилпроизводными заключается в том, что для метиловых эфиров характерно меньшее время удерживания [287]. В работе [288] описано разделение метиловых эфиров N-ацетилпептидов и сполна метилированных пептидов, однако такие производные относительно низко летучи. Хроматографическое поведение ряда N-замещенных производных трипептида $\text{H}_2\text{N}-\text{Val}-\text{Ile}-\text{Ala}-\text{OMe}$ рассмотрено в работе [289].

Метиловые эфиры пептидов можно получить в результате обработки их ацилпроизводных диазометаном, путем их исчерпывающего метилирования [290], а также обработки тионилхлоридом в метаноле или метанольном раствором HCl [282, 291]. В последнем случае этерификация сопровождается частичным расщеплением пептидных связей [292]. Трифторацетилирование пептидов следует проводить при значительно более низкой температуре, чем соответствующую обработку аминокислот [293, 294], или использовать в этих целях вместо ангидрида трифторуксусной кислоты ее метиловый эфир и проводить реакцию в метаноле в присутствии триэтиламина в качестве катализатора [253]. Перечень некоторых производных пептидов и подробные методики их получения приведены в руководстве Кнаппа [187].

2.4.2.2. Разделение пептидов

В силу того что пептиды обладают большей молекулярной массой и более полярны, чем аминокислоты, их газохроматографический анализ является сложной задачей. В настоящее время этим методом анализируют пептиды, содержащие не более пяти аминокислотных остатков. Разделение пептидов проводят на колонках с неполярными неподвижными фазами (например, 1—5% SE-30, SE-52, OV-1, OV-17 или OV-101 [276]), причем стеклянные капиллярные колонки предпочтительнее насадочных, поскольку обладают более высокой разрешающей способностью. Обнаружено, что добавление небольшого количества высокополярной фазы, например полиэтиленгликоля, благоприятствует отделению дипептидов от трипептидов. Величины време-

ни удерживания производных ряда дипептидов приведены в работе [276].

В работе [295] описано разделение триметилсилильных производных дипептидов на кварцевой капиллярной колонке, покрытой фазой SP-2100 (рис. 2.13). Для отнесения хроматографических пиков использованы величины времени удерживания индивидуальных компонентов, найденные в отдельных экспери-

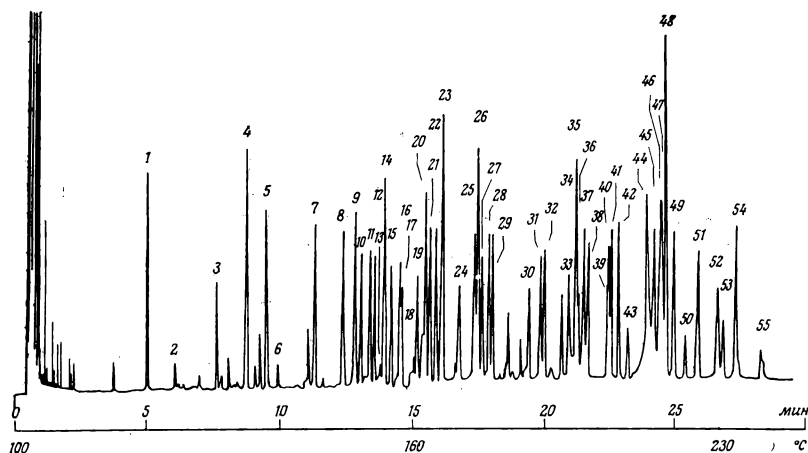


Рис. 2.13. Разделение триметилсилильных производных дипептидов методом газовой хроматографии [295] (с разрешения авторов).

Колонка: кварцевая капиллярная, 12 м×0,2 мм; неподвижная фаза: SP-2100; газ-носитель: гелий, избыточное давление 75 кПа; программирование температуры: увеличение температуры от 100 до 160 °С со скоростью 4 °С/мин и от 160 до 230 °С со скоростью 6 °С/мин, затем изотермический режим в течение 15 мин; температура инжектора и детектора: 250 °С. Каждому пику на хроматограмме отвечает 0,1–1 нг дипептида. Отнесение пиков см. в табл. 10.15.

ментах. Эта методика разделения полезна при установлении первичной структуры пептидов путем их расщепления с помощью дипептидиламинопептидазы с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом продуктов реакции.

2.5. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия внесла существенный вклад в развитие различных областей аналитической химии и к настоящему времени завоевала прочные позиции в качестве мощного инструментального метода анализа. Этот метод отличается универсальностью, высокой чувствительностью (предел обнаружения веществ составляет несколько пикограммов), позволяет опреде-

лять молекулярные массы соединений, а также, особенно в сочетании с ИК-, УФ- или ЯМР-спектроскопией, получать ценную информацию о структуре исследуемых соединений.

Говоря об использовании масс-спектрометрии для анализа аминокислот и пептидов, необходимо учитывать важную особенность метода, заключающуюся в том, что в общем случае ионизации молекул должно предшествовать испарение образца. Это требование, относящееся в первую очередь к ионизации электронным ударом, а также в какой-то степени и к химической ионизации, значительно сужает область применения масс-спектрометрии. Термолабильные и нелетучие вещества можно перевести в газовую фазу с помощью десорбции полем или бомбардировки быстрыми атомами, однако, поскольку способов сочетания таких вариантов масс-спектрометрии с хроматографией пока не существует, эти и аналогичные им методы ионизации в рамках данной книги не рассматриваются. Эта глава посвящена преимущественно хроматомасс-спектрометрии, и поэтому мы ограничимся обсуждением использования электронного удара и химической ионизации, а для знакомства с другими методами ионизации отсылаем читателя к обзорам [296, 297].

2.5.1. Хроматомасс-спектрометрия

Масс-спектрометр является очень чувствительным и селективным детектором, который в принципе пригоден для анализа любых веществ, поддающихся разделению методом газовой хроматографии. Применению хроматомасс-спектрометрии в аналитической химии посвящен обзор [298], а различные технические аспекты сочетания газовой хроматографии с масс-спектрометром рассмотрены в обзоре [299].

2.5.1.1. Аминокислоты

В 1973 г. Перейра и др. [300] описали методику определения аминокислот в экстрактах почв методом хроматомасс-спектрометрии. Этим же авторам удалось провести количественный анализ 12 аминокислот в биологических жидкостях [301], используя соответствующие внутренние стандарты; обнаружение аминокислот проводилось по определенным пикам в масс-спектре. Впоследствии было показано, что для обнаружения и количественной оценки аминокислот в биологических препаратах можно использовать их триметилсилильные производные [302—304]. Опубликовано также сообщение о применении вышеуказанного метода обнаружения для одновременного определения триптофана, триптамина, индолил-3-уксусной кислоты, серотонина и 5-оксииндолил-3-уксусной кислоты в мозге крыс [305]. Даль-

нейшие исследования показали, что для масс-спектрометрического анализа триметилсилильных производных пригоден метод химической ионизации, причем наличие в масс-спектре интенсивного псевдомолекулярного иона MH^+ упрощает идентификацию аминокислот и определение числа триметилсилильных групп [306]. Результаты этой и ряда других работ, в которых использовались различные газы-реагенты (в частности, изобутан и аммиак) [307—310], показали, что масс-спектры, полученные с помощью метода химической ионизации, как правило, проще соответствующих спектров электронного удара и поэтому более удобны для идентификации и количественного определения веществ. Авторы работы [311] изучили спектры химической ионизации некоторых α, ω -диаминокислот, ω -аминокислот, циклических и ациклических α -аминокислот, а также их метиловых эфиров, полученные при взаимодействии этих веществ с ионами SN^+_5 , и нашли корреляционную зависимость между количеством и стабильностью образующихся ионов.

Коллинз и Саммер [312] предложили методику обнаружения глутамина (в виде пироглутамата) и глутаминовой кислоты в биологических жидкостях. Для анализа были использованы N-трифторацетил-*n*-бутиловые эфиры, которые в условиях электронного удара дают ограниченный набор фрагментов. Детектирование фрагментов, образующихся при распаде ионов по α -связи, позволяет надежно идентифицировать указанные аминокислоты. Вскоре после опубликования работ Перейры и сотр. [300, 301] появились сообщения о предпринятых попытках определения аминокислот в препаратах крови [313, 314], а также количественного анализа аминокислот и олигопептидов на уровне фемтомолей [315] и пикомолей [316]. Первоначально внутренними стандартами служили изомеры аминокислот — норлейцин, δ -оксилейцин и 5-аминовалериановая кислота [317], однако впоследствии оказалось, что для этого более пригодны аминокислоты, меченные 2H , ^{13}C , ^{15}N и ^{18}O . Ссылки на ряд работ, в которых для количественного анализа и исследования метаболизма нашли применение меченые аминокислоты, приведены в табл. 2.16.

При определении содержания S-метил-L-цистеина в гемоглобине в качестве внутреннего стандарта был выбран D-изомер этой аминокислоты [339]. Кросли и Рамсен [340] применили метод хроматомасс-спектрометрии в варианте обнаружения по выбранным в масс-спектре ионам для определения уровня тироксинацетата в организме людей с нормальной функцией щитовидной железы и получили значения, которые оказались существенно меньше опубликованных ранее. Этим же методом было определено содержание в биологических жидкостях трииодтиронина и 3,3'-дииодтиронина [341]. Мерфи и Лей [338] предложи-

Таблица 2.16. Меченые аминокислоты, использованные в качестве внутренних стандартов в хроматомасс-спектрометрии

Изотоп	Область применения ^a	Литература
² H	Определение фенилаланина и тирозина (МС)	318—321
² H	Анализ крови (ХИ—МС)	313
² H	Определение ацилглицинов (МС)	322
² H	Определение триптофана (ГХ — МС)	323
² H	Аминокислотный анализ белков и инсулина (ГХ — МС)	324
² H	Изучение метаболизма α -метил-3,4-диоксифенилаланина (ХИ — МС)	325
² H	Определение γ -аминомасляной кислоты (ГХ — МС)	326
² H	Определение глутаминовой кислоты в воде (ГХ — ОВИ)	327
¹³ C	Определение аминокислот в плазме крови (ГХ — ХИ — МС)	328
¹³ C	Определение фенилаланина (ГХ — МС)	329
¹³ C	Определение глицина в тканях головного мозга	330
¹⁵ N	Изучение метаболизма аминокислот	331
¹⁵ N	Определение аминокислот на уровне наномолей	332
¹⁵ N	Определение аминокислот в крови	313
¹⁵ N	Оценка пула аминокислот и скорости их обмена (ГХ — МС)	333, 334
¹⁵ N	Определение аминокислот (ГХ — ХИ — МС)	335
¹⁵ N	Определение аминокислот (МС отрицательных ионов)	336
¹⁵ N	Оценка пула глицина и скорости обмена	337
¹⁵ N	Определение аминокислот в плазме крови (ХИ — МС)	328
¹⁵ N	Определение глицина в тканях головного мозга	330
¹⁸ O	Синтез аминокислот для масс-спектрометрии	338

^a В скобках указан метод анализа: МС — масс-спектрометрия, ХИ — химическая ионизация, ГХ — газовая хроматография, ОВИ — обнаружение по выбранному в масс-спектре иону.

ли изящный способ получения меченных ¹⁸O аминокислот, которые могут служить внутренними стандартами для масс-спектрометрии. Описанная методика изотопного обмена заключается в следующем: раствор 1—4 мг аминокислоты в 0,1—0,2 мл подкисленной Н₂¹⁸O нагревают в течение нескольких дней при 60—70 °С. Таким образом удалось получить 18 меченых аминокислот, причем в указанных условиях включение метки составляло более 90% и не сопровождалось рацемизацией аминокислот.

Дейтерированные аналоги аминокислот были выбраны в качестве внутренних стандартов в недавно опубликованном Рафтером и др. [324] методе аминокислотного анализа белка на хроматомасс-спектрометре, снабженном компьютером. Подробная методика этого анализа приведена ниже.

К 50 мкг белка добавляли 16 дейтерированных аминокислот (по 50—100 мкг каждой) и 100—200 мкл 6 М HCl, содержащей 0,5% фенола (по объему); смесь выдерживали 20 ч в вакууме при 110 °С, упаривали и остаток

высушивали в вакуум-эксикаторе. К полученному остатку добавляли 10%-ный раствор ацетилхлорида в *n*-бутаноле из расчета 150 мкл раствора на 100 мкг аминокислот, смесь запаивали в ампулу, озвучивали 1 мин в водяной бане и выдерживали 15 ± 1 мин в масляной бане при $100 \pm 2^\circ\text{C}$. По окончании этерификации ампулу вскрывали, содержимое переносили в чистую стеклянную пробирку, упаривали в токе азота при комнатной температуре, следы воды удаляли азеотропной отгонкой с дихлорметаном (200 мкл сухого растворителя на образец). Ацилирование проводили обработкой ангидридом трифторуксусной кислоты (20 мкл на 100 мкг аминокислот) в 60 мкл дихлорметана, содержащего 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезол. Ампулу с реакционной смесью

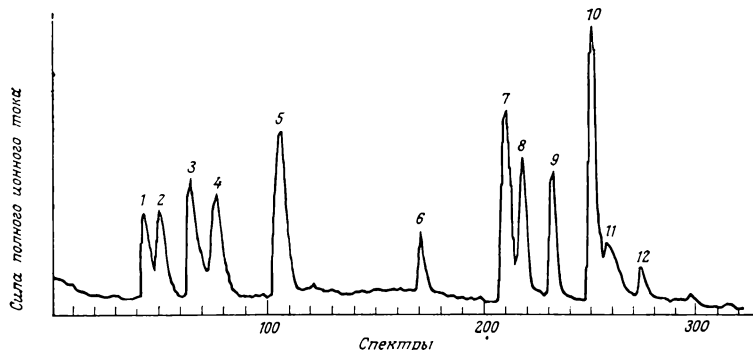


Рис. 2.14. Хроматограмма гидролизата инсулина, к которому добавлены дейтерированные аминокислоты [324] (с разрешения авторов).

Колонка: пирексовая спиральная, 3,7 м×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: 3% OV-17 на хромосорбе WHP, размер частиц 80–100 меш; газ-носитель: гелий; скорость потока: 30 мл/мин; программирование температуры: от 90 до 200 $^\circ\text{C}$ со скоростью 3 $^\circ\text{C}/\text{мин}$; детектор: масс-спектрометр (температура источника ионов: 260 $^\circ\text{C}$; энергия электронов: 22,5 эВ; время съемки одного спектра в диапазоне m/z от 0 до 410; 5 с). Идентифицированы *N*-трифторацетилпроизводные *n*-бутиловых эфиров следующих аминокислот: 1 — аланин; 2 — треонин; 3 — серин и глицин; 4 — валин; 5 — изолейцин и лейцин; 6 — пролин; 7 — аспарагиновой кислоты; 8 — фенилаланин; 9 — тирозин; 10 — глутаминовой кислоты; 11 — лизин; 12 — аргинин.

вскрывали непосредственно перед хроматомасс-спектрометрическим анализом (образцы можно хранить в течение нескольких дней при 0–4 $^\circ\text{C}$). Хроматографирование проводили на спиральной пирексовой колонке 3,7 м×4 мм (внутренний диаметр), заполненной хромосорбом WPH (80–100 меш) с 3% OV-17.

На рис. 2.14 показана хроматограмма, полученная при разделении гидролизата инсулина. Авторы работы [324] сняли полные масс-спектры всех компонентов и по характерному для каждой аминокислоты фрагменту определили изотопные отношения. Для количественного анализа они использовали целый набор внутренних стандартов. Этот метод, опробованный на примере инсулина, дает результаты, которые хорошо согласуются с известными данными о составе указанного белка и с результатами аминокислотного анализа, выполненного параллельно по традиционной схеме методом ионообменной хроматографии.

2.5.1.2. Олигопептиды

Как и аминокислоты, пептиды можно анализировать методом газовой хроматографии только после их превращения в более летучие производные. Поскольку основные проблемы, воз-

никающие при анализе пептидов, обусловлены их сравнительно большой молекулярной массой и взаимодействием полярных функциональных групп с неподвижной фазой, защитные группы должны обладать высокой термостабильностью и не слишком сильно увеличивать молекулярную массу пептида. К настоящему времени разработаны методы газовой хроматографии и хроматомасс-спектрометрии ди-, три- и тетрапептидов, однако анализ пептидов, содержащих остатки аргинина, аспарагина и глутамина, все еще представляют собой весьма сложную задачу.

В принципе масс-спектрометрия позволяет определять последовательность аминокислотных остатков в полипептидах. С описанием соответствующих вариантов этого метода, в частности способов ввода образца непосредственно в ионный источник, методов десорбции полем, бомбардировки тяжелыми атомами и регистрации метастабильных ионов, читатель может познакомиться в работах [296, 342—345]. Здесь же мы рассмотрим только метод хроматомасс-спектрометрии.

Существуют два подхода к определению первичной последовательности пептидов с помощью хроматомасс-спектрометрии. Первый из них заключается в том, что пептид подвергают ступенчатой деградации по Эдману [346, 347] и проводят идентификацию образующихся фенилтиогидантоиновых производных N-концевых аминокислот [324], т. е. в этом случае масс-спектрометру отводится роль аналитического прибора. Другой подход предусматривает частичный протеинолиз пептида (часто под действием дипептидиламинопептидазы), определение структуры фрагментов методом масс-спектрометрии, выявление перекрывающихся участков и последующую реконструкцию последовательности исходного пептида. Этот метод, первоначально рассматривавшийся в качестве альтернативы общепринятым методам определения структуры, может служить хорошим дополнением последних. Так, например, методом масс-спектрометрии можно определять частичные аминокислотные последовательности, установление которых по методу Эдмана сопряжено с теми или иными трудностями, и наоборот. Такой подход был использован, в частности, при структурном анализе монеллина [348], а также в работе [349].

Чтобы разработать методику идентификации всех четырехсот возможных дипептидов по их масс-спектрам, Крутц и Пизано [350] изучили картины фрагментации триметилсилильных производных около двухсот дипептидов [350] и более чем для сорока из них сравнили масс-спектры химической ионизации и электронного удара [351, 352]. Как выяснилось, при электронном ударе образуется больше фрагментов, чем при химической ионизации, и, как следствие, ион ($M^+ - 15$) образуется с очень низким выходом (см. рис. 2.15), что существенно затрудняет оп-

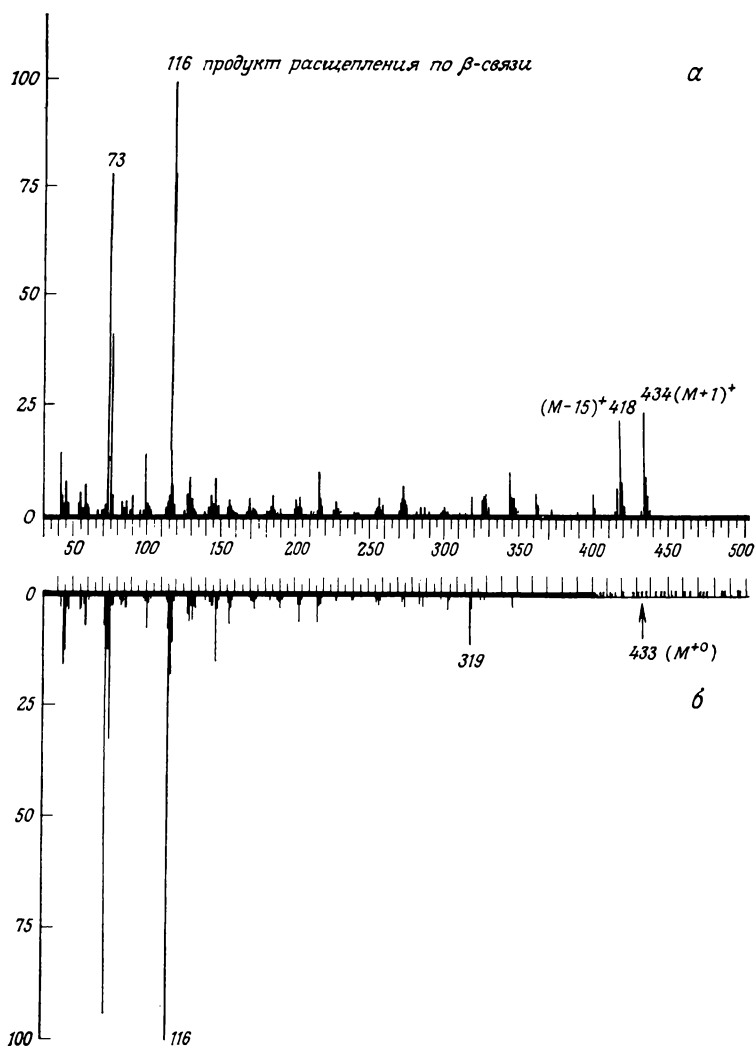
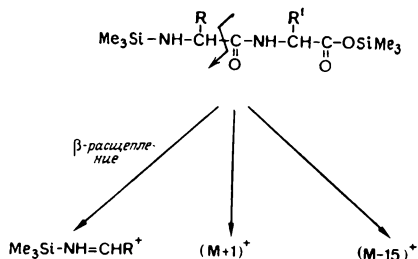


Рис. 2.15. Спектры химической ионизации (а) и электронного удара (б) дипептида $\text{Me}_3\text{Si}-\text{Ala}-\text{Gln}-\text{OSiMe}_3$ [352] (с разрешения авторов).

а) газ-реагент: изобутан, давление паров 6,67 мПа; сила тока: 50 мкА; энергия ионов: 150 эВ; ускоряющее напряжение: 3,5 кВ; б) сила тока ионизации: 50 мкА; энергия электронов: 70 эВ; ускоряющее напряжение: 3,5 кВ. Образцы вводят в масс-спектрометр либо непосредственно, либо после разделения на газовом хроматографе.

ределение молекулярной массы соединения, если его количество не превышает 0,1 нмоль. В отличие от метода электронного удара метод химической ионизации позволяет однозначно идентифицировать анализируемое соединение, поскольку в соответствующем масс-спектре присутствуют три достаточно интенсивных пика, отвечающие характеристическим ионам:



В качестве примера на рис. 2.15 показаны масс-спектры дипептида $\text{Me}_3\text{Si}-\text{Ala}-\text{Gln}-\text{OSiMe}_3$, полученные методами электронного удара и химической ионизации. Значения масс ионов, образующихся при β -расщеплении триметилсилильных производных различных дипептидов, приведены в табл. 2.17. Исходя из этих величин и молекулярной массы дипептида, можно вычислить, какой аминокислотный остаток является С-концевым, и таким образом установить структуру пептида.

Зейферт и др. [353] на примере метиловых эфиров 120 пентафторпропионилдипептидов показали, что, используя газовую хроматографию в сочетании с масс-спектрометрическим методом химической ионизации или электронного удара, можно разделять разнообразные смеси таких производных и идентифицировать их компоненты. В ряде случаев удалось осуществить масс-спектрометрический анализ олигопептидов, содержащих до семи аминокислотных остатков. Следует, однако, отметить, что все вышеупомянутые производные пептидов обладают довольно низкой летучестью. Это обусловлено наличием в их молекулах незащищенных NH-групп, которые способны участвовать в образовании водородных связей. Более летучие производные можно получить, проведя исчерпывающее метилирование пептидов [187, 357] или восстановление N-ацетилпептидов до соответствующих полиаминоспиртов и последующее триметилсилилирование гидроксильных групп [355, 356]. В последнем случае образуются производные, летучесть которых даже выше, чем у сполна метилированных пептидов. Если же в качестве защитной группы вместо ацетильного остатка использовать гептафторбутирильный, то с помощью указанной методики можно получить наиболее летучие из всех известных в настоящее время производных пептидов [357—362].

Таблица 2.17. Ионы, используемые для идентификации триметилсилильных производных дипептидов

Аминокислотный остаток	Масса иона, образующегося при расщеплении по β -связи, если остаток является N-концевым	Масса, которую необходимо прибавить к массе иона, образующегося при расщеплении по β -связи, чтобы получить величину $(M+1)$, если остаток является C-концевым	Масса иона $(ArCH_2)^+$
Gly ^a	102	175	91
Ala	116	189	
Abu	130	203	
Pro	142	215	
Val	144	217	
Leu	158	231	
Ile	158	231	
Met	176	249	
Phe	192	265	
Ser	204	277	
Thr	218	291	
Asn	231	304	
Asp	6	305	
Gln	245	318	
Glu	246	319	
His	254	327	154
Cys (C ₂ H ₄ NH ₂) ^b	263	336	
Cys (CH ₂ CONH ₂)	277	350	
Cys (CH ₂ COOH)	278	351	179
Tyr	280	353	
Orn	303	376	
Trp	303	376	202
Lys	317	390	
Arg	142 (интенсивный пик)	490	
	417 (слабый пик)		

^a Дипептиды, содержащие в качестве C-концевых остатки Abu, Ala, Arg, Gln, Glu, Gly, Met или Lys, образуют дикетопиперазины.

^b N-Концевой остаток Asp циклизуется с образованием пятичленного имида; чтобы найти массу псевдомолекулярного иона $(M+1)^+$, к величине, отвечающей C-концевому остатку, следует прибавить 158.

^c Согласно современным данным, более чем в 90% молекул триметилсилильный остаток связан не с α -, а с ϵ -аминогруппой.

Франк и Дезидерио [363] описали новый метод восстановления олигопептидов бораном. Для установления первичной структуры образующихся при этом аминоспиртов достаточно всего лишь 10—100 нмоль вещества [364]. Модифицированный вариант методики хроматомасс-спектрометрического анализа, предложенной Ноо и др. [358, 362], был использован Стейнером и Ни-

дервизером [365] для определения олигопептидов в моче. Чтобы исключить возможность расщепления пептидных связей на стадии этерификации, к метанолу вместо HCl добавляли тионилхлорид, а чтобы получаемые масс-спектры были более информативными, для восстановления производных пептидов наряду с

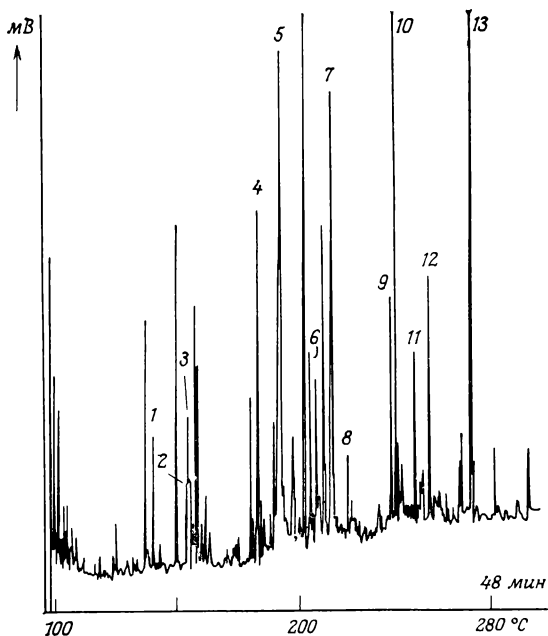


Рис. 2.16. Анализ пептидов мочи методом хромато-масс-спектрометрии [365] (с разрешения авторов).

Колонка: стеклянная капиллярная, 25 м×0,28 мм; неподвижная фаза: SE-30; газ-носитель: гелий, избыточное давление 0,12 МПа; программирование температуры: 3 мин при 100 °C и последующее увеличение температуры до 300 °C со скоростью 4 °C/мин; температура инжектора: 300 °C; температура ионизационной камеры: 215 °C; ток ионизации: 50 мкА; энергия ионов: 20 эВ; скорость съемки масс-спектра: 10 m/z в секунду.
1 — Gly—Pro; 2 — лизин; 3 — фенилаланин; 4 — Pro—Hyp; 5 — гистидин; 6 — тирозин; 7 — Pro—Hyp; 8 — Gly—Hyp—Gly; 9 — Glu—Hyp; 10 — Gly—Pro—Hyp; 11 — Phe—Hyp; 12 — Gly—Hyp—Hyp; 13 — Gly—Pro—Hyp—Gly.

LiAlH₄ использовали LiAlH₄. На рис. 2.16 показано разделение пептидных компонентов мочи, а на рис. 2.17 приведены масс-спектры электронного удара гидрированного и дейтерированного производного тетрапептида Gly—Pro—Pro(4OH)—Gly. Молекулярные массы соединений найдены методом химической ионизации (в качестве газа-реагента использован изобутан).

Насколько нам известно, во всех экспериментах по хромато-масс-спектрометрии олигопептидов проводили обнаружение

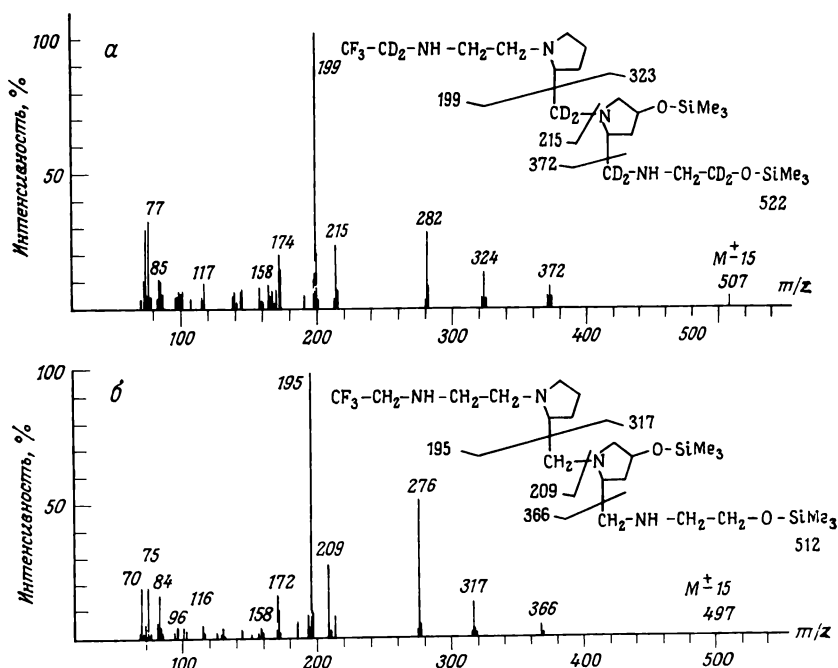


Рис. 2.17. Масс-спектры химической ионизации дейтерированного (а) и гидрированного (б) производного тетрапептида Gly—Pro—Pro(4OH)—Gly [365] с разрешения авторов). Условия работы газового хроматографа и масс-спектрометра см. в подписи к рис. 2.16.

только катионов, хотя было бы логичнее проводить обнаружение не катионов, а анионов, особенно если соединение содержит много атомов галогенов. Введение в практику исследований метода импульсной химической ионизации положительными и отрицательными ионами, предложенного Хантом и др. [366], позволило бы не только повысить чувствительность масс-спектрометрического анализа, но и использовать преимущества обоих способов ионизации молекул.

Литература

1. Niederwieser A. — In: Chromatography, a Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods./Ed. Heftmann E. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 393.
2. Bremer H. J., Duran M., Kamrling J. P., Przyrembel H., Wadman S. K. Clinical Chemistry and Diagnosis, Baltimore, MD: Urban and Schwarzenberg, 1981.
3. Stein W. H., Moore S. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 14, 179 (1949).

4. Moore S., Stein W. H. J. Biol. Chem., **192**, 663 (1951).
5. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H. Anal. Chem., **30**, 1185, 1190 (1958).
6. Cronin J. R., Pizzarello S., Gandy W. E. Anal. Biochem., **93**, 174 (1979).
7. Kobayashi Y. Anal. Biochem., **105**, 48 (1980).
8. Spadaro A. C. C., Draghetta W., Del Lama S. N., Camargo A. C. M., Greene L. J. Anal. Biochem., **96**, 317 (1979).
9. Beecher G. R. Adv. Exp. Med. Biol., **105**, 827 (1978).
10. Parvy P., Huang Y., Kamoun P. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **17**, 205 (1979).
11. Castets J. C., Parvy P., Allard D., Huang Y. Ann. Biol. Clin., **36**, 143 (1978).
12. Olek K., Uhlhaas S., Wardenbach P. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **16**, 283 (1978).
13. Hare T. A., Bala Manyam N. V. Anal. Biochem., **101**, 349 (1980).
14. Böhlen P., Schechter P. J., van Damme W., Coquillat G., Dosch J. C., Koch-Weser J. Clin. Chem., **24**, 256 (1978).
15. Kuo K. C., Cole T. F., Gehrke C. W., Waalkes T. P., Borek E. Clin. Chem., **24**, 1373 (1978).
16. Evered D. F., Barley J. F. Clin. Chim. Acta, **84**, 339 (1978).
17. Böhlen P., Mellet M. Anal. Biochem., **94**, 313 (1979).
18. Szymanowicz A., Poulin G., Randoux A., Borel J. P. Clin. Chim. Acta, **91**, 141 (1979).
19. Szymanowicz A., Malgras A., Randoux A., Borel J. P. Biochim. Biophys. Acta, **576**, 253 (1979).
20. Ward L. C., Anal. Biochem., **88**, 598 (1978).
21. Tarbit I. F., Richardson J. P., Dale G. J. Chromatogr., **181**, 337 (1980).
22. Menezo Y., Voulot C., Ortonne J. P., Khatchadourian C. Arch. Dermatol. Res., **263**, 267 (1978).
23. Marini J. L., Williams S. P., Sheard M. H. Pharmacol. Biochem. Behav., **11**, 183 (1979).
24. Bisbee W. C., Kelleher P. C. Clin. Chim. Acta, **90**, 29 (1978).
25. Bisbee W. C., Kelleher P. C. J. Chromatogr., **145**, 473 (1978).
26. Friedman M., Noma A. T., Wagner J. R. Anal. Biochem., **98**, 293 (1979).
27. Hardman R., Abu-Al-Futuh I. M. Planta Med., **36**, 79 (1979).
28. Villanueva V. R., Adlakha R. C. Anal. Biochem., **91**, 264 (1978).
29. Degen J., Kyte J. Anal. Biochem., **89**, 529 (1978).
30. Johnson P. J. Chromatogr., **17**, 406 (1979).
31. Bachner L., Boissel J.-P., Wajcman H. J. Chromatogr., **193**, 491 (1980).
32. Takeuchi S., Fuzita K., Nakaziwa F., Arikawa Y. Nippon Kagaku Kaishi, **64** (1978).
33. Wright J. C., Evilia R. F. J. Liquid Chromatogr., **2**, 719 (1979).
34. Gardner W. S. Marine Chem., **6**, 15 (1978).
35. Dawson R., Pritchard R. G. Marine Chem., **6**, 27 (1978).
36. Muzarelli R. A. A., Tanfani F., Muzarelli M. G., Scarpini G., Rocchetti R. Separ. Sci. Technol., **13**, 869 (1978).
37. Kent S. B. H., Mitchell A. R., Barany G., Merrifield R. B. Anal. Chem., **50**, 155 (1978).
38. Tommel D. K. J., Vliegenthart J. F. G., Penders T. J., Arens J. F. Biochem. J., **99**, 48 (1966).
39. Tommel D. K. J., Vliegenthart J. F. G., Penders T. J., Arens J. F. Biochem. J., **107**, 335 (1967).
40. Clapperton F. J. J. Inst. Brew., **77**, 177 (1971).
41. Polzhofter K. P., Ney K. H. Tetrahedron, **28**, 1721 (1972).
42. Rothenbühler E., Waibel R., Solms J. Anal. Biochem., **97**, 367 (1979).
43. Lutz W., Markewicz K., Klyszejko-Stefanowicz K. Clin. Chim. Acta, **39**, 319, 425 (1972).

44. *Niederwieser A., Curtius H. Ch. J. Chromatogr., 51, 491 (1970).*
45. *Giliberti P., Niederwieser A. J. Chromatogr., 66, 261 (1972).*
46. *Gallo-Torres H. E., Miller O. N., Ludorf J. Anal. Biochem., 64, 260 (1975).*
47. *Sampson B., Barlow G. B. J. Chromatogr., 183, 9 (1980).*
48. *Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd Edn., New York: Wiley, 1979, p. 125.*
49. *Scott R. P. W. Liquid Chromatography Detectors. New York: Elsevier, 1977.*
50. *Milano M. J., Lam S., Savonis M., Pautler D. B., Pav J. W., Grushka E. J. Chromatogr., 149, 599 (1978).*
51. *Hamilton R. J., Sewell P. A. Introduction to High-Performance Liquid Chromatography. London: Chapman and Hall, 1977, Chap. 3.*
52. *Denton M. S., De Angelis T. P., Yacynych A. M., Heineman W. R., Gilbert T. W. Anal. Chem., 48, 20 (1976).*
53. *Dessey R. E., Nunn W. G., Titus C. A., Renolds W. R. J. Chromatogr. Sci., 14, 195 (1976).*
54. *Somack R., Anal. Biochem., 104, 464 (1980).*
55. *Diebold G. J., Zare R. N. Science, 196, 1439 (1977).*
56. *Hodgin J. C. J. Liquid Chromatogr., 2, 1047 (1979).*
57. *Huber J. F. K., van Urk-Schoen A. M., Sieswerda G. B. Z. Anal. Chem., 264, 257 (1973).*
58. *Schmid E. R., Fogy I., Heresch F., Kenndler E., Huber J. F. K. Mikrochim. Acta, 207 (1979).*
59. *Caroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N., Haegle K. D., Horning E. C. Anal. Chem., 47, 2369 (1975).*
60. *Jones P. R., Yang S. K. Anal. Chem., 47, 1000 (1975).*
61. *McLafferty F. W., Knutti R., Venkataakhavan R., Arpino P. J., Dawkins B. G. Anal. Chem., 47, 1503 (1975).*
62. *Scott R. P. W., Scott C. G., Munroe M., Hess J., Jr. J. Chromatogr., 122, 389 (1976).*
63. *McFadden W. H., Schwartz H. L., Evans S. J. Chromatogr., 122, 389 (1976).*
64. *Erdahl W. L., Privett O. S. Lipids, 12, 797 (1977).*
65. *Blakley C. R., Vestal M. L. 25th Ann. Conf. Mass Spectrom., Washington, DC, 1977, p. 376.*
66. *Blakley C. R., Carnody J. C., Vestal M. L. Clin. Chem., 26, 1467 (1980).*
67. *Serum J. W., Melera A. 26th Ann. Conf. Mass Spectrom., St. Louis, MO, 1978, p. 655.*
68. *Arpino P. J., Krien P. 26th Ann. Conf. Mass Spectrom., St. Louis, MO, 1978, p. 426.*
69. *Takeuchi T., Hiraka Y., Okumura Y. Ann. Chem., 50, 659 (1978).*
70. *Udseth H. R., Orth R. G., Futrell J. H. 26th Ann. Conf. Mass Spectrom., St. Louis, MO, 1978, p. 659.*
71. *McFadden W. H., Bradford D. C., Games D. E., Gauer J. L. Amer. Lab., 9, 55 (1977).*
72. *Arpino P. J., Colin H., Guiochon G. 25th Ann. Conf. Mass Spectrom., Washington, DC, 1977, p. 189.*
73. *McFadden W. H. J. Chromatogr. Sci., 18, 97 (1980).*
74. *Arpino P. J., Guiochon G. Anal. Chem., 51, 683A (1979).*
75. *Kenndler E., Schmid E. R. — In: Instrumentation in High-Performance Liquid Chromatography./Ed. Huber J. F. K. Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 163.*
76. *Karger B. L., Kirby D. P., Vonros P., Foltz R. L., Hidy B. Anal. Chem., 51, 2324 (1979).*
77. *Desidorio D. M., Stein J. L., Cunningham M. D., Sabbatini J. Z. J. Chromatogr., 195, 369 (1980).*

78. Dawkins B. G., Arpino P. J., McLafferty F. M. Biomed. Mass Spectrom., 5, 1 (1978).
79. Schuster R. Ann. Chem., 52, 617 (1980).
80. Kroeff E. P., Pietrzyk D. J. Anal. Chem., 50, 502 (1978).
81. Horn M. J., Hargrave P. A., Wang J. K. J. Chromatogr., 180, 111 (1979).
82. Zimmermann C. C., Apella E., Pisano J. J. Anal. Biochem., 77, 569 (1977).
83. Yamabe T., Takai N., Nakamura H. J. Chromatogr., 104, 359 (1975).
84. Beyer H., Schenk U. J. Chromatogr., 39, 482 (1969).
85. Harmeyer J., Sallmann H.-P., Ayoub L. J. J. Chromatogr., 32, 258 (1968).
86. Voelter W., Zech K. J. Chromatogr., 112, 643 (1975).
87. Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmman R. Anal. Chem., 48, 1106 (1976).
88. Wilkinson J. M. J. Chromatogr. Sci., 16, 547 (1978).
89. Schmidt G. J., Olson D. C., Slavin W. Perkin-Elmer Chromatogr. News Lett., 7, 10 (1979).
90. Hodgkin J. C. J. Liquid Chromatogr., 2, 1024 (1979).
91. Hill D. W., Walters F. H., Wilson T. D., Stuart J. D. Anal. Chem., 51, 1338 (1979).
92. Garnier J. P., Bousquet B., Dieux C. Analysis, 7, 355 (1979).
93. Lindroth P., Mopper K. Anal. Chem., 51, 1667 (1979).
94. Friedman Z., Smith H. W., Hancock W. S. J. Chromatogr., 182, 414 (1980).
95. Gardner W. S., Miller W. H. Anal. Biochem., 101, 61 (1980).
96. Reed D. J., Babson J. R., Beathy P. W., Brodie A. E., Ellis W. W., Potter D. W. Anal. Biochem., 106, 55 (1980).
97. Bachmann F. W., Frei J. Chromatographia, 12, 345 (1979).
98. Chang J. Y., Lehmann A., Wittman-Liebold B. Anal. Biochem., 102, 380 (1980).
99. Wassner S. J., Schlitzer J. L., Li J. B. Anal. Biochem., 104, 284 (1980).
100. Klapper G., Wilde C. E., Capra J. D. Anal. Biochem., 85, 126 (1978).
101. Zeeuw R., Strosberg A. D. FEBS Lett., 85, 68 (1978).
102. Margolies M. N., Brauer A. J. Chromatogr., 148, 429 (1978).
103. Bhow N. A. S., Mole J. E., Weissinger A., Bennett J. C. J. Chromatogr., 148, 532 (1978).
104. Elton J., Downing M., Mann K. J. Chromatogr., 155, 436 (1978).
105. Abrahamsson M., Grönningsson K., Castensson S. J. Chromatogr., 154, 313 (1978).
106. Strickland M., Strickland W. N., Brandt W. F., van Holt C., Wittmann-Liebold B., Lehmann A. Eur. J. Biochem., 89, 443 (1978).
107. Oestvold G., Jensen E., Greibrokk T. Medd. Norsk. Farm. Selsk., 40, 173 (1978).
108. van Beenmann J., van Damme J., Deley J. FEBS Lett., 85, 68 (1978).
109. Hahnkapiller M. W., Hood L. E. Biochemistry, 17, 2124 (1978).
110. Fong G. W., Grushka E. Anal. Chem., 50, 1154 (1978).
111. Moo-Penn W. F., Johnson M. H., Bechtel K. C., Jue D. L. J. Chromatogr., 172, 476 (1979).
112. Annan W. D. J. Chromatogr., 173, 194 (1979).
113. Harris J. U., Robinson D., Johnson A. J. Anal. Biochem., 105, 239 (1980).
114. Horn M. J., Hargrave P. A., Wang J. K. J. Chromatogr., 180, 111 (1979).
115. Moser P. W., Rickli E. E. J. Chromatogr., 176, 451 (1979).
116. Spatz R., Roggendorf E. Z. Anal. Chem., 299, 267 (1979).
117. Godtfredsen S. E., Oliver R. W. A. Carlsberg Res. Commun., 45, 35 (1980).
118. Scott R. P. W., Kucera P. J. Chromatogr., 169, 51 (1979).
119. Scott R. P. W. J. Chromatogr. Sci., 18, 49 (1980).
120. Weinstein S., Feibush B., Gil-Av E. J. Chromatogr., 126, 97 (1976).

121. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V. J. Chromatogr., **91**, 493 (1974).
122. Krull I. S. Advan. Chromatogr., **16**, 175 (1977).
123. Nambara T., Ikegawa S., Hasegawa M., Goto J. Anal. Chim. Acta, **101**, 111 (1978).
124. Snyder R. V., Angelici R. J., Meck R. B. J. Amer. Chem. Soc., **94**, 2660 (1972).
125. Davankov V. A., Zolotarev Y. A. J. Chromatogr., **155**, 303 (1978).
126. Gubitz G., Jellenez W., Lofler G., Santi W. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **2**, 145 (1979).
127. Lefebvre B., Audebert R., Quivron C. J. Liquid Chromatogr., **1**, 761 (1978).
128. Tsuchida E., Nishikawa H., Terada E. Eur. Polym. J., **12**, 611 (1976).
129. Chow F. K., Grushka E., Anal. Chem., **50**, 1346 (1978).
130. Baczuk R. J., Landram G. K., Dubois R. J., Dehm H. C. J. Chromatogr., **60**, 351 (1971).
131. Sousa L. R., Sogah G. D. Y., Hoffman D. H., Cram D. J. J. Amer. Chem. Soc., **100**, 4569 (1978).
132. Pirkle W. H., House D. W. J. J. Org. Chem., **44**, 1957 (1979).
133. Hara S., Dobashi A. J. J. Liquid Chromatogr., **2**, 883 (1979).
134. Yoneda H., Yoshizawa T. Chem. Lett., 707 (1976).
135. Chow F. K., Grushka E. J. Chromatogr., **185**, 361 (1979).
136. Hare P. E., Gil-Av E. Science, **204**, 1226 (1979).
137. Gilon C., Leshem R., Tapuhi Y., Grushka E. J. Amer. Chem. Soc., **101**, 7612 (1979).
138. LePage J. N., Lindner J. W., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L. Anal. Chem., **51**, 433 (1979).
139. Lindner W., LePage J. N., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L. J. Chromatogr., **185**, 323 (1979).
140. Gilon C., Leshem R., Grushka E. Anal. Chem., **52**, 1206 (1980).
141. Audebert R. J. Liquid Chromatogr., **2**, 1063 (1979).
142. Kullmann W. J. Liquid Chromatogr., **2**, 1017 (1979).
143. Gabriel T. F., Michalewsky J., Meienhofer J. J. Chromatogr., **129**, 287 (1976).
144. Gil-Av E. — In: Peptides./Ed. Wolman Y. New York: Wiley, 1974, p. 247.
145. Molnár I., Horváth Cs. J. Chromatogr., **142**, 623 (1977).
146. Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Harding D. R., Hearn M. T. W. Science, **200**, 1168 (1978).
147. Rivier J. J. Liquid Chromatogr., **1**, 343 (1978).
148. Lundanes E., Greibrokk T. J. Chromatogr., **149**, 241 (1978).
149. Nice E. C., O'Hare M. J. J. Chromatogr., **162**, 401 (1979).
150. Hearn M. T. W., Bishop C. A., Hancock W. S., Harding D. R. K., Reynolds G. D. J. Liquid Chromatogr., **2**, 1 (1979).
151. Terabe S., Konaka R., Inouye K. J. Chromatogr., **172**, 163 (1979).
152. O'Hare M. J., Nice E. C. J. Chromatogr., **171**, 209 (1979).
153. Bishop C. A., Harding D. R. K., Meyer L. J., Hancock W. S., Hearn M. T. W. J. Chromatogr., **192**, 222 (1980).
154. Schaaper W. M. M., Voskamp D., Olieman C. J. Chromatogr., **195**, 181 (1980).
155. Abrahamsson M., Grönningsson K. J. Liquid Chromatogr., **3**, 495 (1980).
156. Lin S.-N., Smith L. A., Caprioli R. M. J. Chromatogr., **197**, 31 (1980).
157. Hearn M. T. W., Grego B., Hancock W. S. J. Chromatogr., **185**, 429 (1979).
158. Nachtman F. J. Chromatogr., **176**, 391 (1979).
159. Voskamp D., Olieman C., Beyermann H. C. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **99**, 105 (1980).

160. Hancock W. S., Bishop C. A., Battersby J. E., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. *J. Chromatogr.*, **168**, 377 (1979).
161. Meek J. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **77**, 1632 (1980).
162. Kroeff E. P., Pietrzyk D. J. *Anal. Chem.*, **50**, 502 (1978).
163. Lundanes E., Greibrokk T. J. *Chromatogr.*, **149**, 241 (1978).
164. Voetler W., Bauer H., Fuchs S., Pietrzyk E. J. *Chromatogr.*, **153**, 433 (1978).
165. Larsen B., Viswanatha V., Chang S. Y., Hruby V. J. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 207 (1978).
166. Larsen B., Fox B. L., Hruby V. J. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **13**, 12 (1979).
167. Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Harding D. R. K. *Science*, **200**, 1168 (1978).
168. Karger B. L., Giese R. W. *Anal. Chem.*, **50**, 1048A (1978).
169. Fong G. W. K., Grushka E. *Anal. Chem.*, **50**, 1154 (1978).
170. Kroeff E. P., Pietrzyk D. J. *Anal. Chem.*, **50**, 1353 (1978).
171. Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. *J. Chromatogr.*, **153**, 391 (1978).
172. Hancock W. S., Bishop C. A., Meyer L. J., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. *J. Chromatogr.*, **161**, 291 (1978).
173. Fischer L. J., Thies R. L., Charkowski D. *Anal. Chem.*, **50**, 2143 (1978).
174. Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Hearn M. T. W. *Anal. Biochem.*, **89**, 203 (1978).
175. Kratzin H., Yang C., Krusche J. U., Hilschmann N. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1591 (1980).
176. Schroeder W. A., Shelton J. R., Powars D. J. *Chromatogr.*, **174**, 385 (1979).
177. Dizdaroglu M., Simic M. G. *J. Chromatogr.*, **195**, 119 (1980).
178. Witter A., Scholtens H., Verhoeff J. *Neuroendocrinology*, **30**, 377 (1980).
179. Couletr J. R., Hann C. S. — In: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*./Eds. Niederwieser A. and Pataki G. *Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ.*, 1971, p. 75.
180. Blau K. — In: *Biomedical Application of Gas Chromatography*./Ed. Szymanski H. A. *New York: Plenum*, 1968, p. 1.
181. Hušek P., Macek K. J. *Chromatogr.*, **113**, 139 (1975).
182. Low M. F., Hamilton P. B. — In: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 25./Ed. Glick D. *New York: Wiley-Interscience*, 1977, p. 203.
183. Pocklington R. *Anal. Biochem.*, **45**, 403 (1972).
184. Zumwalt R. W., Roach D., Gehrke C. W. *J. Chromatogr.*, **53**, 171 (1970).
185. Lewis A. M., Waterhouse C., Jacobs L. S. *Clin. Chem.*, **26**, 271 (1980).
186. Hunter I. R., Dimick K. P., Corse J. W. *Chem. Ind.*, **16**, 294 (1956).
187. Knapp D. R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. *New York: Wiley*, 1979.
188. Birkhofer R., Ritter A. *Chem. Ber.*, **93**, 424 (1960).
189. Smith E. D., Shewbart K. L. *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 704 (1969).
190. Gehrke C. W., Leimer K. J. *Chromatogr.*, **53**, 201 (1970).
191. Gehrke C. W., Nakamoto H., Zumwalt R. W. *J. Chromatogr.*, **45**, 24 (1969).
192. Gehrke C. W., Leimer K. J. *Chromatogr.*, **57**, 219 (1971).
193. Bergstrom K., Gurtler J., Blomstrand R. *Anal. Biochem.*, **34**, 74 (1970).
194. Laseter J. L., Weete J. D., Albert A., Walkinshaw C. H. *Anal. Lett.*, **4**, 671 (1971).
195. Abramson F. P. *Anal. Biochem.*, **57**, 482 (1974).
196. Smith E. D., Shewbart K. L. *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 704 (1969).
197. Birkofer L., Donike M. J. *Chromatogr.*, **26**, 270 (1967).
198. Donike M. J. *Chromatogr.*, **85**, 1 (1973).
199. Donike M., Suberg H., Jaenicke L. J. *Chromatogr.*, **85**, 9 (1973).
200. Shahrokhi F., Gehrke C. W. *J. Chromatogr.*, **36**, 31 (1968).

201. Butts W. C. *Anal. Biochem.*, **46**, 187 (1972).
202. Middleditch B. S. *J. Chromatogr.*, **126**, 581 (1976).
203. Vielma H., Mendez J. J. *Chromatogr.*, **196**, 166 (1980).
204. Conacher H. B., Iyenegar J. R., Miles W. F., Botting H. G. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 604 (1979).
205. Biemann K., Seibl J., Gapp F. *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 3795 (1961).
206. Bayer E. Z. *Naturforsch.*, **22B**, 924 (1967).
207. Hagen P. B., Black W. *Can. J. Biochem.*, **43**, 309 (1965).
208. Cruickshant P. A., Sheehan J. C. *Anal. Chem.*, **36**, 1191 (1964).
209. Fu S.-C. J., Mak D. S. H. *J. Chromatogr.*, **54**, 205 (1971).
210. Fu S.-C. J., Mak D. S. H. *J. Chromatogr.*, **78**, 211 (1973).
211. Zumwalt R. W., Kuo K., Gehrke C. W. *J. Chromatogr.*, **57**, 193 (1971).
212. Gehrke C. W. *Quantitative Gas-Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances*. Columbia, MO: *Anal. Biochem. Labs.*, 1968.
213. Roach D., Gehrke C. W. *J. Chromatogr.*, **44**, 269 (1969).
214. Hardy J. P., Kerrin S. L. *Anal. Chem.*, **44**, 1497 (1972).
215. Watson E., Wilk S., Roboz J. *Anal. Biochem.*, **59**, 441 (1974).
216. Bertilsson L., Costa E. *J. Chromatogr.*, **118**, 395 (1976).
217. Blau N. personal communication.
218. Johnson D. E., Scott S. J., Meister A. *Anal. Chem.*, **33**, 669 (1961).
219. Gehrke C. W., Takeda H. *J. Chromatogr.*, **76**, 63 (1973).
220. Pollock G. E. *Anal. Chem.*, **39**, 1194 (1967).
221. Parr W., Yang C., Pleterski J., Bayer E. *J. Chromatogr.*, **50**, 510 (1970).
222. Zanetta J. P., Vincendon G. *J. Chromatogr.*, **76**, 91 (1973).
223. Moss C. W., Lambert M. A., Diaz F. J. *J. Chromatogr.*, **60**, 134 (1971).
224. Johnson J., Eyem J., Sjöquist J. *Anal. Biochem.*, **51**, 204 (1973).
225. Roach D., Gehrke C. W. *J. Chromatogr.*, **43**, 303 (1969).
226. Gehrke C. W., Kuo K., Zumwalt R. W. *J. Chromatogr.*, **57**, 209 (1971).
227. Roach D., Gehrke C. W., Zumwalt R. W. *J. Chromatogr.*, **43**, 311 (1969).
228. Yoneda T. *Anal. Biochem.*, **104**, 247 (1980).
229. Leighton W. P., Rosenblatt S., Chanley J. D. *J. Chromatogr.*, **164**, 427 (1979).
230. Sarkar S. K., Malhotra S. S. *J. Chromatogr.*, **170**, 371 (1979).
231. MacKenzie S. L., Tenaschuk D. *J. Chromatogr.*, **171**, 195 (1979).
232. MacKenzie S. L., Tenaschuk D. *J. Chromatogr.*, **173**, 53 (1979).
233. Gabrys J., Konecki J. *J. Chromatogr.*, **182**, 147 (1980).
234. Kirkman M. A., Burell M. M., Lea P. J., Mills W. R. *Anal. Biochem.*, **101**, 364 (1980).
235. Perier C., Ronzière M. C., Rattner A., Frey J. J. *Chromatogr.*, **182**, 155 (1980).
236. Gil-Av E., Feibush B., Charles-Sigler R. — In: *Gas Chromatography*, Sixth Intern. Symp./Ed. Littlewood A. B. Dorking: Bartholomew, 1967, p. 227.
237. Gil-Av E., Feibush B., Charles-Sigler R. *Tetrahedron Lett.*, 1009 (1966).
238. Gil-Av E., Feibush B. *Tetrahedron Lett.*, 3345 (1967).
239. Feibush B., Gil-Av E. *Tetrahedron*, **26**, 1361 (1970).
240. Nakaparksin S., Birell P., Gil-Av E., Oro J. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 177 (1970).
241. Bayer E., Gil-Av E., Koenig W. A., Nakaparksin S., Oro J., Parr W. *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 1738 (1970).
242. Koenig W., Parr W., Lichtenstein H., Bayer E., Oro J. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 183 (1970).
243. Parr W., Yang C., Bayer E., Gil-Av E. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 591 (1970).
244. Parr W., Howard P. *Chromatographia*, **4**, 162 (1971).
245. Corbin J. A., Rhoad J. E., Rogers L. B. *Anal. Chem.*, **43**, 327 (1971).
246. Parr W., Howard P. *J. Chromatogr.*, **66**, 141 (1972).
247. Parr W., Howard P. *J. Chromatogr.*, **67**, 227 (1972).

248. Lochmüller C. H., Harris J. M., Souter R. W. J. *Chromatogr.*, **71**, 405 (1972).
249. Lochmüller C. H., Gross P. M. *Separ. Purif. Methods.*, **8**, 21 (1979).
250. Frank H., Nicholson C. J., Bayer E. J. *Chromatogr. Sci.*, **15**, 174 (1977).
251. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E. J. *Chromatogr.*, **167**, 187 (1978).
252. Frank H., Rettenmeier A., Weicker H., Nicholson G. J., Bayer E. *Clin. Chim. Acta*, **105**, 201 (1980).
253. Weygand F., Kolb B., Prox A., Tilak M. A., Tomida I. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **322**, 38 (1960).
254. Weygand F., Prox A., Schmidhammer L., Koenig W. *Angew. Chem.*, **75**, 282 (1963).
255. Weygand F., Prox A., Schmidhammer L., Koenig W. — In: *Peptides*/Eds. Beyerman H. C., van de Linde A., Maassen van den Brink W. Oxford: Pergamon, 1963, p. 97.
256. Gil-Av E., Charles-Sigler R., Fischer G., Nurok D. J. *Gas Chromatogr.*, **4**, 51 (1966).
257. Pollok G. E., Oyama V. I. *J. Gas Chromatogr.*, **4**, 126 (1966).
258. Pollok G. E., Oyama V. I., Johnson R. D. *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 174 (1965).
259. Westley J. W., Halpern B., Karger B. L. *Anal. Chem.*, **40**, 2046 (1968).
260. Ayers G. S., Monroe R. E., Mossholder J. H. *J. Chromatogr.*, **63**, 259 (1971).
261. Pollok G. E., Kawauchi A. H. *Anal. Chem.*, **40**, 1356 (1968).
262. Charles-Seigler R., Fischer G., Gil-Av E. *Isr. J. Chem.*, **1**, 234 (1963).
263. Gil-Av E., Charles R., Fischer G. J. *Chromatogr.*, **17**, 408 (1965).
264. Kuenholden K., Peterson E., Brown F. *Science*, **169**, 1079 (1970).
265. Kuenholden K., Lawless J., Pering K., Peterson E., Flores J., Ponnamperuma C., Kaplan I. R., Moore C. *Nature (London)*, **228**, 923 (1970).
266. Lawless J., Kuenholden K., Peterson E., Ponnamperuma C., Moore C. *Science*, **173**, 626 (1971).
267. Pollok G. E., Frommhagen L. H. *Anal. Biochem.*, **24**, 18 (1968).
268. Pollok G. E. *Anal. Chem.*, **44**, 2368 (1972).
269. Lawless J. G., Kuenholden K., Peterson E., Ponnamperuma C., Jaroszewich E. *Nature (London)*, **236**, 66 (1972).
270. Halpern B., Pollok G. E. *Biochem. Med.*, **4**, 352 (1970).
271. Ponnamperuma C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56** (1972).
272. Halpern B., Westley J. W. *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2283 (1966).
273. Dabrowiak J. C., Cooke D. W. *Anal. Chem.*, **43**, 791 (1971).
274. Iwase H., Murai A. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 8 (1974).
275. Weygand F., Kolb B., Kirchner P. Z. *Anal. Chem.*, **181**, 396 (1961).
276. Kolb B. — In: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*/Eds. Niederwieser A., Pataki G. Ann Arbor, MI, Ann Arbor Sci. Publ., 1971, p. 129.
277. Barooshian A. V., Lautenschleger M. J., Harris W. G. *Anal. Biochem.*, **44**, 543 (1971).
278. Raulinn F., Khare B. N. *J. Chromatogr.*, **75**, 13 (1973).
279. Weygand F., Prox A., Jorgensen E. C., Axen R., Kirchner P. Z. *Naturforsch.*, **18b**, 93 (1963).
280. Weygand F. Z. *Anal. Chem.*, **243**, 2 (1968).
281. Tomida I., Tokuda T., Ohashi J., Nakajima M. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **39**, 391 (1965).
282. Prox A., Weygand F. — In: *Peptides*/Eds. Beyerman H. C., van den Linde A., Maassen van den Brink W. Amsterdam: North Holland, 1967, p. 158.
283. Bayer E., Koenig W. A. *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 95 (1969).
284. Weygand F., Hoffmann D., Prox A. Z. *Naturforsch.*, **23b**, 279 (1968).
285. Prox A., Schmid J., Ottenheim H. *Liebigs Ann. Chem.*, **722**, 179 (1969).

286. Mee J. M. L. J. *Chromatogr.*, **87**, 258 (1973).
287. Andersson B. A. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 2906 (1967).
288. Calam D. H. J. *Chromatogr.*, **70**, 146 (1972).
289. Prox A., Sun K. K. Z. *Naturforsch.*, **21b**, 1028 (1966).
290. Leclercq P. A., Desiderio D. M. *Anal. Lett.*, **4**, 1028 (1971).
291. Wieland T., Lueben G., Ottenheim H., Faesel J., de Fries J. X., Konz W., Prox A., Schmid J. *Angew. Chem.*, **80**, 209 (1968).
292. Aplin R. T., Eland I., Jones J. H. *Org. Mass Spectrom.*, **2**, 795 (1969).
293. Cruickshank P. A., Sheehan J. C. *Anal. Chem.*, **36**, 1191 (1964).
294. Weygand F., Geiger R. *Chem. Ber.*, **89**, 647 (1956).
295. Dizdaroglu M., Simic M. G. *Anal. Biochem.*, **108**, 269 (1980).
296. Schulten H.-R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **32**, 97 (1979).
297. Milne G. W. A., Lacey M. J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Cleveland, OH: CRC, 1974, p. 45.
298. ten Noever de Brauw M. C. J. *Chromatogr.*, **165**, 207 (1979).
299. McFadden W. E. J. *Chromatogr. Sci.*, **17**, 2 (1979).
300. Pereira W. E., Hoyano Y., Reynolds W. E., Summons R. E., Duffield A. M. *Anal. Biochem.*, **55**, 236 (1973).
301. Summons R. E., Pereira W. E., Reeynolds W. E., Rindfleisch T. C., Duffield A. M. *Anal. Chem.*, **46**, 582 (1974).
302. Iwase H., Takeuchi Y., Murai A. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1307 (1979).
303. Leimer K. R., Rice R. H., Gehrke C. W. J. *Chromatogr.*, **141**, 355 (1977).
304. Wiecek C., Halpern B., Sargeson A. M., Duffield A. M. *Org. Mass Spectrom.*, **14**, 281 (1979).
305. Artigas F., Gelpi E. *Anal. Biochem.*, **92**, 233 (1979).
306. Takimoto M., Takeda T., Takahashi S., Murata T. *Shimazu Hyoron.*, **34**, 159 (1977); *C.A.*, **89**, 163926h (1978).
307. Budzikiewicz H., Meissner G. *Org. Mass Spectrom.*, **13**, 608 (1978).
308. Okada K., Sakuno A. *Org. Mass Spectrom.*, **13**, 535 (1978).
309. Shieh J. J., Leung K., Desiderio D. M. *Anal. Lett.*, **10**, 575 (1977).
310. Jo D.-H., Desgrès J., Padieu P. J. *Chromatogr.*, **146**, 413 (1978).
311. Weinkam R. J. J. *Org. Chem.*, **43**, 2581 (1978).
312. Collins F. S., Summer G. K. J. *Chromatogr.*, **145**, 456 (1978).
313. Mee J. M. L., Korth J., Halpern B., James L. B. *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 178 (1977).
314. Schulman M. F., Abramson F. P. *Biomed. Mass Spectrom.*, **2**, 9 (1975).
315. Abramson F. P., McCaman M. W., McCaman R. E. *Anal. Chem.*, **51**, 482 (1974).
316. Frick W., Chang D., Folkers K., Daves G. D., Jr. *Anal. Chem.*, **49**, 1241 (1977).
317. Callery P. S., Stogniew M., Geelhaar L. A. *Biomed. Mass Spectrom.*, **6**, 23 (1979).
318. Trefz F. K., Byrd D. J., Blaskovics M. E., Kochen W., Lutz P. *Clin. Chim. Acta*, **73**, 431 (1976).
319. Zagalak M.-J., Curtius H.-Ch., Leimbacher W., Redweik U. J. *Chromatogr.*, **142**, 523 (1977).
320. Fell V., Hoskins J. A., Pollit R. J. *Clin. Chim. Acta*, **83**, 259 (1978).
321. Hoskins J. A., Pollit R. J. — In: *Stable Isotopes: Applications in Pharmacology, Toxicology and Chemical Research*/Ed. Baillie T. A. London: Macmillan, 1978, p. 253.
322. Ramsdell H. S., Baretz B. H., Tanaka K. *Biomed. Mass Spectrom.*, **4**, 220 (1977).
323. Curtius H.-Ch., Wegmann H., Pedweik U., Leimbacher W. — In: *Stable Isotopes: Proc. 3rd Intern. Conf./Eds. Klein E. R., Klein P. D.* New York: Academic Press, 1979, p. 573.
324. Rafter J. J., Ingelmann-Sundberg M., Gustafson J. A. *Biomed. Mass Spectrom.*, **6**, 317 (1979).

325. *Castagnoli N., Melmon K. L., Freed C. R., Ames M. M., Kalir A., Weinkam R.* — In: *Stable Isotopes*,/Ed. Baillie. Baltimore, MD, Univ. Park Press, 1978, p. 261.
326. *Colby B. N., McCaman M. W.* Biomed. Mass Spectrom., 5, 215 (1978).
327. *Coutts R. T., Jones G. R., Lin S.-F. J.* Chromatogr. Sci., 17, 551 (1979).
328. *Mathews D. E., Ben-Galim E., Bier D. M.* Anal. Chem., 51, 80 (1979).
329. *Halliday D., Madigan M., Ell S., Richards P., Bergström J., Fürst P.* — In: *Stable Isotopes*, Proc. 3rd Intern. Conf./Eds. Klein E. R., Klein P. D. New York: Academic Press, 1979, p. 582.
330. *Lapin A., Karobath M. J.* Chromatogr., 193, 95 (1980).
331. *Hirano S. Taisha*, 14, 1495 (1977).
332. *McReynold J. H., Anbar M.* Anal. Chem., 49, 1832 (1977).
333. *Irving C. S., Nissim I., Lapidot A.* Biomed. Mass Spectrom., 5, 117 (1978).
334. *Irving C. S., Nissim I., Lapidot A.* Monogr. Hum. Genet., 9, 50 (1978).
335. *Robinson J. R., Starrat A. N., Schlaethka E. E.* Biomed. Mass Spectrom., 5, 648 (1978).
336. *Voight D., Schmidt J.* Biomed. Mass Spectrom., 5, 44 (1978).
337. *Lapidot A., Nissim I., Irving C. S., Liberman U. A., Samuel R.* — In: *Stable Isotopes*, 3rd Intern. Conf./Eds. Klein E. R., Klein P. D. New York: Academic Press, 1979, p. 599.
338. *Murphy R. C., Lay K. L.* Biomed. Mass Spectrom., 6, 309 (1979).
339. *Bailey E., Farmer P. B., Lamb J. H. J.* Chromatogr., 200, 145 (1980).
340. *Crossley D. N., Ramsden D. B.* Clin. Chim. Acta, 94, 267 (1979).
341. *Heki N.* Nippon Naibumpi Gakkai Zasshi, 54, 1157 (1978).
342. *Biemann K.* — In: *Biomedical Applications of Mass Spectrometry*, 1st Suppl./Eds. Waller G. R., Dermer O. C. New York, J. Wiley, 1980, p. 469.
343. *Schlunegger U. P.* Angew. Chem., 87, 731 (1975).
344. *Schlunegger U. P., Hirter P.* Isr. J. Chem., 17, 168 (1978).
345. *Steinauer R., Walther H. J., Schlunegger U. P.* Helv. Chim. Acta, 63, 610 (1980).
346. *Rosmus J., Deyl Z. J.* Chromatogr., 70, 221 (1972).
347. *Rosmus J., Deyl Z.* Chromatogr. Rev., 13, 163 (1971).
348. *Hudson G., Biemann K.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 212 (1976).
349. *Rees M. W., Casey R., Short M. N., Sexton J. J., March J. F., Eagles J., Parsley K. R., Self R.* Biomed. Mass Spectrom., 7, 132 (1980).
350. *Krutzsch H. C., Pisano J. J.* Methods Enzymol., 47, 391 (1977).
351. *Krutzsch H. C., Pisano J. J.* Biochemistry, 17, 2791 (1978).
352. *Krutzsch H. C., Kindt T. J.* Anal. Biochem., 92, 525 (1979).
353. *Seifert W. E., McKee R. L., Beckner C. F., Caprioli R. M.* Anal. Biochem., 88, 149 (1978).
354. *Das B. C., Lederer E.* — In: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*,/Eds. Niederwieser A., Pataki G. — Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1971.
355. *Biemann K., Gapp F., Seibl J. J.* Amer. Chem. Soc., 81, 2274 (1959).
356. *Biemann K., Vetter W.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 3, 578 (1960).
357. *Weygand F., Geiger R.* Chem. Ber., 89, 647 (1956).
358. *Nau H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 1088 (1974).
359. *Nau H.* Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 15, 75 (1976).
360. *Nau H., Biemann K.* Anal. Biochem., 73, 139, 154, 175 (1976).
361. *Kelley J. A., Nau H., Foerster H.-J., Biemann K.* Biomed. Mass Spectrom., 2, 313 (1975).
362. *Nau H., Foerster H.-J., Biemann K.* Biomed. Mass Spectrom., 2, 326 (1975).
363. *Frank H., Desiderio D. M.* Anal. Biochem., 90, 413 (1978).
364. *Mahajan V. K., Desiderio D. M.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 1104 (1978).
365. *Steiner W., Niederwieser A.* Clin. Chim. Acta, 92, 431 (1979).
366. *Hunt D. F., Stafford G. C., Jr., Crow F. M., Russel J. W.* Anal. Chem., 48, 2098 (1976).

Глава 3

Белки

Николас Кацимпулас

3.1. Введение

Применение хроматографических и электрофоретических методов для разделения белков в последние двадцать лет оказало огромное влияние на развитие современной биохимии. Поскольку белки обладают различными биологически важными функциями (такими, как ферментативные, гормональные, регуляторные, иммунохимические и др.), хроматография и электрофорез с успехом применяются в исследовательских и клинических целях в самых различных областях биологии и медицины.

Приступая к разделению белков, необходимо тщательно подобрать рН, ионную силу, температуру, электролит и носитель, поскольку от перечисленных условий зависят физико-химические и биологические свойства каждого отдельного белка. Формирование высших структур (т. е. вторичной, третичной и четвертичной), а также надмолекулярных агрегатов обусловлено ионными и гидрофобными взаимодействиями и образованием водородных связей. Эти же взаимодействия определяют и процесс разделения. Очевидно, условия хроматографии должны быть такими, чтобы выделенный продукт сохранил определенные представляющие интерес свойства, каковые, как правило, связаны с сохранением его нативного состояния и биологической активности. В то же время для определения физических свойств субъединиц белка часто его необходимо денатурировать и с этой целью подвергнуть жесткой обработке (например, мочевиной или гидрохлоридом гуанидина) с последующей химической модификацией (например, расщепить дисульфидные связи и блокировать сульфгидрильные группы). Таким образом, конкретная задача определяет выбор метода разделения белков. Следует также отметить, что в процессе разделения нативных белков участвуют функциональные группы, расположенные на поверхности. Однако если белки полностью или частично денатурированы, появляются новые группы, ранее скрытые внутри макромолекулы, которые могут изменить не только силу, но и природу взаимодействия белка с сорбентом. В результате при хроматографиче-

ском разделении белков необходимо решить ряд специфических вопросов.

Необходимым условием разделения белков является их растворимость в используемом буферном растворе. Этим обстоятельством часто пренебрегают, и во многих случаях в результате анализируется только растворимая часть образца. Поскольку растворимость многих белков зависит от pH и ионной силы, ее характеристика особенно важна, если белковую смесь хроматографируют в градиенте pH или ионной силы. Особенно наглядно влияние растворимости прослеживается при проведении электрофореза в полиакриламидном геле: агрегированный материал не может войти в гель и остается на старте.

Другим специфическим вопросам, возникающим при сопоставлении хроматографических свойств белков и малых молекул, является вопрос о внутренних стандартах. В хроматографии малых молекул данный вопрос решен достаточно определенно. Хотя некоторые очищенные белки и используются в качестве внутренних стандартов молекулярной массы в гель-хроматографии и при электрофорезе в полиакриламидном геле, они не могут рассматриваться как универсальные стандарты, поскольку предполагается, что молекулы таких белков в нативном состоянии имеют сферическую форму, а в денатурированном — форму полностью развернутой спирали, а применительно к целому ряду белков, особенно к гликопротеидам, это предположение может оказаться несостоятельным. Таким образом, имеющиеся «стандарты» применимы не во всех случаях.

При хроматографии и электрофорезе белков использование органических растворителей исключается из-за их денатурирующего действия, в результате которого белки переходят в нерастворимое состояние. Подобное действие могут оказывать и некоторые органические соединения. Поэтому при разделении белков необходим тщательный выбор селективных водных буферных систем. Однако необходимость солиubilизации белков, в особенности тех из них, которые ассоциированы с биологическими мембранами, привела к введению детергентов — как ионных, так и неионных, а также таких реагентов, как мочевины и гидрохлорид гуанидина, которые разрывают водородные связи и препятствуют гидрофобным взаимодействиям. Даже будучи денатурированными, многие белки остаются растворимыми в присутствии этих соединений, особенно после расщепления дисульфидных связей дитиотретиолом или меркаптоэтанолом.

3.2. Хроматография белков

3.2.1. Гель-хроматография

Теория и методология гель-хроматографии подробно обсуждается в ряде обзоров и книг [1—9]*. Этот метод позволяет разделять белки в соответствии с размерами их молекул. Первыми с колонки элюируются самые большие молекулы, в то время как молекулы меньшего размера, способные диффундировать в поры матрицы, заполненные жидкой фазой, удерживаются на колонке. Размер пор матрицы геля определяет диапазон молекулярных масс макромолекул, способных проникать в частицы геля и выходить из них. Для фракционирования белков пригодны различные полиакриламидные, агарозные и декстрановые гели.

С момента разработки этого метода гель-хроматография наиболее часто используется для препаративного фракционирования белков, причем обычно как первый этап разделения. Поскольку разрешающая способность этого метода низка, хроматографические фракции могут содержать несколько компонентов и необходимо дальнейшее разделение другими способами. Анализ смеси неизвестного состава первоначально проводят на гелевой матрице с широким диапазоном фракционирования, собирают фракцию, содержащую интересующий белок, и разделяют ее на геле с более узким диапазоном фракционирования. Выделенную в результате фракцию разделяют далее методом ионообменной хроматографии или электрофореза.

Другой областью применения гель-хроматографии в биохимии является отделение белков от низкомолекулярных мешающих анализу примесей, например аминокислот, сахаров, стероидов или реагентов, используемых для химической модификации белка. Методом гель-хроматографии чаще всего удаляют реагенты, предназначенные для введения в белок радиоактивной и флуоресцентной меток. Гель-хроматография позволяет также быстрее и эффективнее, чем диализ, осуществить обессоливание или смену буфера, требуемые в определенных схемах фракционирования, а также удаление кофакторов и ингибиторов, используемых при изучении кинетики ферментативных реакций. Кроме того, с помощью этого метода можно изучать связывание белков с низкомолекулярными соединениями, например лекарственными веществами, ионами металлов и красителями [10]. Коэффициент распределения K_d некоего «стандартного» белка с из-

* См. также следующие монографии: Бельский Б. Г., Виленчик Л. З. Хроматография полимеров. — М.: Химия, 1978, 344 с.; Жидкостная колоночная хроматография. В 3-х томах. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янека. — М.: Мир, 1978; Kremmer T., Boross L., Gel Chromatography, Budapest, Akademiai Kiado, 1979. — Прим. ред.

вестной молекулярной массой можно использовать для оценки молекулярной массы белков, имеющих подобную форму. Порат [11] показал, что $K_d^{1/3}$ и $MW^{1/2}$ (MW — молекулярная масса) связаны линейной зависимостью. Уравнение основано на предположении, что поры геля имеют различную форму (сферическую, воронкообразную или щелеобразную) и что эффективным радиусом макромолекулы является радиус вращения. Эта модель в течение нескольких лет позволяла с успехом проводить интерпретацию результатов гель-хроматографии. Авторы работ [12, 13] проводили обработку результатов при помощи следующего выражения:

$$\operatorname{erfc}^{-1} K_{av} = a + b \lg R_s \quad (3.1)$$

где K_{av} — коэффициент доступности (коэффициент объемного распределения); a и b — коэффициенты регрессии; R_s — радиус Стокса (или $MW^{1/3}$); erfc^{-1} — обратная величина дополнения функции ошибок.

Эта модель предполагает справедливость гауссова распределения для эффективных радиусов пор геля и эффективного радиуса молекулы белка, который идентичен гидродинамическому радиусу Стокса. Если принять «логистическое» распределение размеров пор, то применимо следующее выражение:

$$K_{av} = 1/[1 + (MW/c)^b] \quad (3.2)$$

где MW — молекулярная масса, а c и b — эмпирические постоянные. Это выражение можно линеаризовать [14], используя график зависимости логита K_{av} от $\lg MW$:

$$\text{логит } K_{av} = a + b \lg MW \quad (3.3)$$

где

$$\text{логит } Y = \ln [Y/(1-Y)] \quad (3.4)$$

Логит-преобразования и обратная функция ошибок приводят к значительной вариабельности дисперсии, так что необходимо использовать взвешенную регрессию [15]. В случае статистического клубка (развернутые белки) эффективный радиус вращения (R_g) принимается пропорциональным квадратному корню из молекулярной массы (R_g пропорционален $MW^{0.5}$) [11].

Оценку молекулярной массы можно выполнять только для очищенных белков, исключение составляют лишь те ферменты, которые можно определить в исследуемых фракциях при помощи биологических тестов. Быстрая аналитическая гель-хроматография белков и пептидов и анализ их молекулярно-массового распределения описаны подробно Кацимпуласом и Кенни [16—18] и Соса [19].

3.2.2. Ионообменная хроматография

Ионообменную хроматографию белков [20] выполняют на ионообменниках, имеющих гидрофильную матрицу, например на целлюлозе и декстране. Анионообменники, особенно DEAE-целлюлозу и DEAE-сефадекс, используют чаще, чем катионообменники типа CM-целлюлозы. Ионообменники на основе целлюлозы имеют открытую сетчатую структуру с ионизованными центрами, легкодоступными для белков. Число ионных связей, образующихся между обменником и белком, зависит не только от используемого материала, но также в большой степени от pH и ионной силы буфера. Эти ионные пары постоянно диссоциируют и образуются вновь, так как ионы элюента конкурируют за центры обмена. Обменники, пригодные для фракционирования белков, имеют низкую плотность зарядов, поэтому число ионных связей между ионитом и отдельными молекулами белка не столь велико, чтобы вообще воспрепятствовать продвижению последних вдоль колонки. Хотя ионные связи постоянно диссоциируют и образуются вновь, в начале хроматографирования белок связывается с ионообменником и не элюируется с колонки. Однако когда концентрация небольших конкурирующих ионов буфера возрастает до такого уровня, что все связи одновременно разрываются, белок начинает двигаться вниз по колонке. Если в процессе разделения используют градиент ионной силы, белок, перемещающийся в стартовой зоне медленнее, чем буфер, элюируется им при увеличении концентрации ионов. Таким образом, элюирующая способность буферного раствора постоянно увеличивается и макромолекула перемещается все быстрее и быстрее. Скорость ее перемещения становится сравнимой со скоростью движения жидкости, когда в элюенте достигается такая концентрация соли, которая эффективно препятствует взаимодействию молекулы белка с обменником. Важное значение в каждом отдельном случае имеет профиль градиента: чтобы увеличить разрешение пиков в определенных участках хроматограммы, используемый градиент должен быть сравнительно пологим, но в то же время достаточно крутым в других участках, чтобы избежать уширения пиков.

Размеры молекул белков также влияют на ширину хроматографических пиков. Молекулы белков с очень высокой молекулярной массой, часто состоящие из большого числа субъединиц, могут связываться с обменником различными участками, и, поскольку каждый из таких участков содержит несколько ионных центров, сила взаимодействия может быть различной. В процессе перемещения белка вдоль колонки во взаимодействие с обменником в различные моменты времени оказываются задейст-

вованными различные участки белка, что способствует уширению хроматографической зоны.

Свойства некоторых ионообменников и их использование подробно обсуждаются в обзорах [20—22]. Карбоксиметилцеллюлоза (СМ-целлюлоза), СМ-сефадекс, фосфоцеллюлоза (Р-целлюлоза), сульфометилцеллюлоза (SM-целлюлоза) и сульфопропилсефадекс (SP-сефадекс) — типичные катионообменники, пригодные для фракционирования основных белков. К числу анионообменников относятся аминоэтилцеллюлоза (АЕ-целлюлоза), диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE-целлюлоза), DEAE-сефадекс, ЕСТЕОЛА-целлюлоза, триэтиламиноэтилцеллюлоза (ТЕАЕ-целлюлоза) и 2-оксипропиламиносефадекс (QAE-сефадекс) [20]. Кислотно-основная емкость этих ионообменников составляет 0,1—4,5 мэкв./г; исключением является лишь Р-целлюлоза, кислотно-основная емкость которой достигает 7,4 мэкв./г. Ионообменники делят на сильные, например QAE, SP, и слабые, например DEAE, СМ.

Разделение белков на катионообменниках проводят в 1—10 мМ ацетатном, цитратном или глициновом буфере либо в растворе ацетата аммония (летучая соль). Если же разделение ведется на анионообменниках, используют трис-НСl, трис-фосфатный и фосфатный буферы, а также раствор карбоната аммония (летучая соль). Для получения градиента ионной силы к буферным растворам добавляют соли, например NaCl или KCl, не обладающие буферной емкостью. Если хроматографию проводят в градиенте pH, то при разделении на анионообменниках pH уменьшают, а при разделении на катионообменниках — увеличивают. В обоих случаях ионная сила возрастает.

Хорошим практическим руководством по ионообменной хроматографии является книга Петерсона [20].

3.2.3. Аффинная хроматография

В последние десять лет метод аффинной хроматографии [23—27] играет важную роль при выделении биологически активных белков. В этом методе колонки заполняют нерастворимым носителем, с которым ковалентно связаны лиганды, обладающие сродством к выделяемому белку (так называемые аффинные лиганды). Когда раствор смеси различных веществ проходит через такую колонку, на ней сорбируется лишь интересующий исследователя белок, а все остальные соединения вымываются. Сорбированный на колонке белок выделяют, либо нарушая взаимодействие макромолекулы с иммобилизованным лигандом, либо воздействуя на него конкурирующим лигандом, присутствующим в элюирующем буфере. Такого рода специфические взаимодействия возникают между ферментами и их ингибитора-

ми или кофакторами, антигенами и антителами, гормонами и рецепторами, лектинами и гликопротеидами, малыми молекулами и транспортирующими или связывающими их белками.

Хотя существует много методов ковалентного связывания лиганда с полимерным носителем, наибольшее распространение получил метод, основанный на активации носителя бромцианом [28]. Активированный носитель, например агароза или полиакриламид, вступает в реакцию с аминогруппами лиганда. Часто, чтобы облегчить комплексообразование с большими молекулами или малыми лигандными группами, между носителем и лигандом встраивают углеводородную цепь длиной до 10 атомов углерода [29—30]. При выборе лиганда следует учитывать его сродство к выделяемому белку, способ связывания, концентрацию лиганда, тип изотермы сорбции и влияние температуры.

После того как белок связан с лигандом и примеси удалены, проводят специфическое или неспецифическое элюирование сорбированной макромолекулы. Неспецифические методы элюирования предусматривают изменение ионной силы, pH, диэлектрической проницаемости буферного раствора либо введение денатурирующих агентов, например мочевины или гидрохлорида гуанидина. Все эти методы направлены на уменьшение сродства белка к лиганду в результате конформационных изменений последнего. Предполагается, что после такой обработки белок сохраняет способность ренатурировать. Специфические методы элюирования обычно включают конкуренцию какого-то другого лиганда или белка, подобного выделяемому, за центр связывания.

Особый вид аффинной хроматографии включает использование гидрофобных взаимодействий между доступными гидрофобными центрами белка и гидрофобными лигандами на носителе [31—34]. В этом случае десорбция происходит при уменьшении ионной силы и увеличении pH или при элюировании растворами этиленгликоля и детергентов.

3.2.4. Адсорбционная хроматография

При использовании метода адсорбционной хроматографии для разделения белков наиболее приемлемыми адсорбентами оказались различные модификации фосфата кальция, в особенности оксиапатит [35—38]. Недостатком этого метода является получение размытых хроматограмм, что обусловлено характером изотермы адсорбции. Кривая зависимости количества адсорбированного белка от его концентрации в подвижной фазе имеет резкий излом вблизи насыщающей концентрации белка в подвижной фазе. По мере продвижения белка вниз по колонке «хвост», содержащий небольшое количество вещества, удержи-

вается сильнее, чем основной пик. Поэтому использование низких начальных концентраций может улучшить разделение, если белки адсорбируются не слишком сильно.

3.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Первые работы по быстрому хроматографическому разделению белков были проведены с использованием сефадексов G-25 и G-50 (сшитых декстранов) [16—18]. Позднее были получены новые сорбенты, не разрушающиеся при высоких скоростях потока элюента и обладающие большой емкостью [39]. К числу таких сорбентов относятся силикагель и стекла с контролируемым размером пор, а также стекла и силикагель с привитыми фазами [40—44]. Обычно при скоростях потока от 0,5 до 1 мл/мин процесс разделения белков занимает менее 20 мин.

В качестве ионообменников применяют ковалентно и нековалентно связанные неподвижные фазы [45] и макропористые гидрофильные полимеры [46]. Аффинную ВЭЖХ проводят на связанных со специфическими лигандами носителях [47]. Несомненно, этот метод фракционирования будет находить все более широкое применение в клинических и аналитических лабораториях.

3.3. Электрофорез белков

3.3.1. Общая классификация методов

Электрофорезом называют физический процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле постоянного тока. Заряды на поверхности белков возникают вследствие ионизации карбоксильных, amino-, имидазольных, фенокси- и сульфгидрильных групп, а также при связывании ионов. Многочисленные методы электрофореза, предназначенные для разделения белков, классифицируют в зависимости от типа электролитической системы, типа носителя и даже конструкции аппаратуры и способа обнаружения*.

В зависимости от типа электролитических систем различают а) зонный электрофорез при постоянном значении pH, или просто электрофорез [48—57]; б) изоэлектрическое фокусирование в градиенте pH [58—64]; в) изотахофорез с ведущими и за-

* Более подробно методы электрофореза обсуждаются в кн.: Гааль Э., Медьеш Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Прим. ред.

мыкающими ионами [58, 61, 62, 65]; г) многофазный зонный электрофорез (диск-электрофорез) [66, 67].

Стабилизирующая среда при электрофорезе либо проявляет едва заметные свойства молекулярного сита (например, среда, применяемая для создания градиента плотности [68], ацетат целлюлозы [69] и агароза [51]), либо значительно тормозит

миграцию молекул (например, среда, применяемая для электрофореза в крахмальном [54, 70] и полиакриламидном геле [66, 67, 70, 71]). Стабилизации зоны при электрофоретическом разделении можно достичь, используя действие капиллярных сил либо механическое вращение в специальном устройстве. Эти методы известны как электрофорез в свободном потоке [72], в свободной зоне [73], с «бесконечной лентой» жидкости [74] и в непрерывном потоке [75]. В зависимости от размеров и формы стабилизирующей среды различают электрофорез в колонке, блоке, пластинках и тонком слое [49, 54, 55]. Эти же названия применимы и к

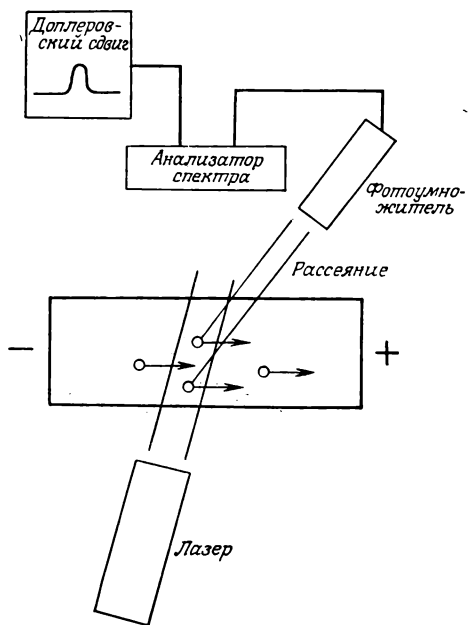


Рис. 3.1. Метод лазерного электрофоретического светорассеяния.

двумерному гель-электрофорезу [76], к которому относятся также иммуноэлектрофорез [53, 56, 57] и иммуноэлектрофокусирование [77]; так как они включают иммунодиффузию во втором направлении.

Другие, в основном приборные, методы связаны со способом обнаружения разделенных веществ и определения их электрофоретической подвижности. Так, в методе рассеяния света [78] скорость движения частиц определяют по доплеровскому смещению частоты света, рассеиваемого этими частицами, а в электрофорезе ТРАНС [79] для получения кинетических характеристик, по которым можно оценить физико-химические характеристики молекул, проводят многократное оптическое сканирование разделенных веществ.

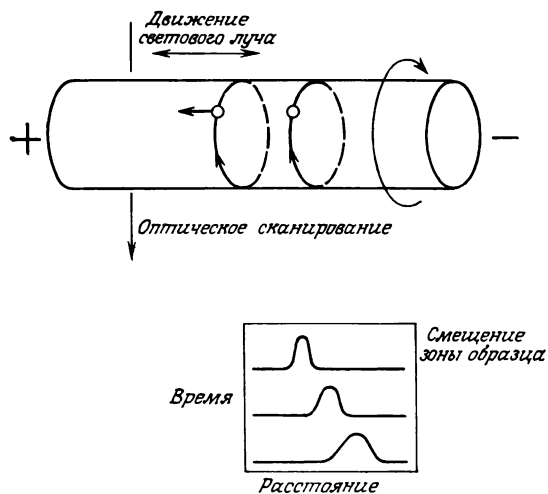


Рис. 3.2. Электрофорез в горизонтальной трубке (стабилизация зон центробежной силой).

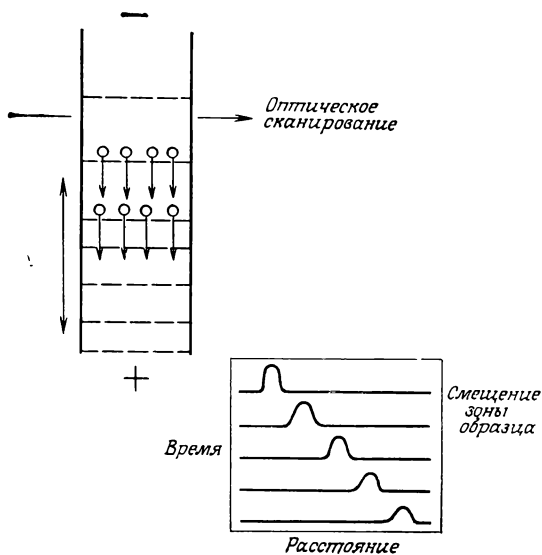


Рис. 3.3. Электрофорез в вертикальной колонке (стабилизация зон градиентом плотности).

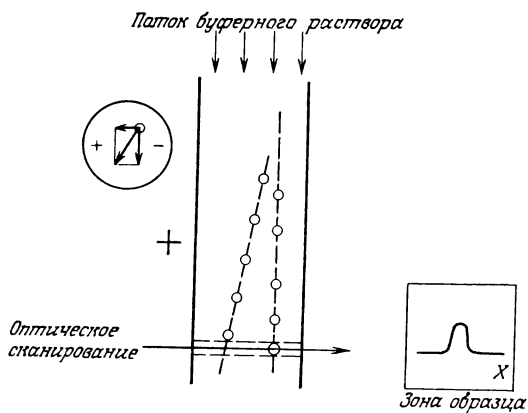


Рис. 3.4. Электрофорез в свободном потоке.

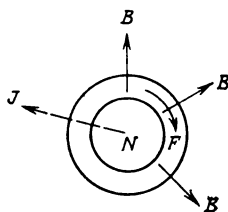
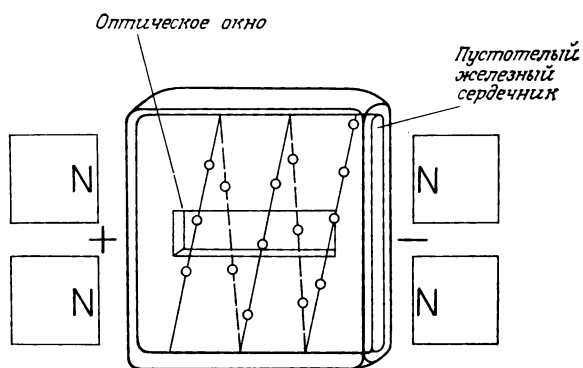


Рис. 3.5. Электрофорез с «бесконечной лентой» жидкости.

N — северный полюс магнита; B — магнитное поле; F — электромагнитная сила; J — плотность тока (от наблюдателя).

3.3.2. Приборы для аналитического электрофореза

Основы метода электрофореза с подвижной границей, предназначенного для определения электрофоретической подвижности белков, рассмотрены в работах [80, 81]. В настоящее время этот метод не применяется и представляет только исторический интерес.

Метод лазерного электрофоретического светорассеяния был введен в 1971 г. Варом и Фляйгером [82]. Этот метод, в котором объединены измерение скорости на основе эффекта Доплера и электрофорез в свободном растворе, позволяет определить подвижность относительно чистых белков всего за несколько секунд (рис. 3.1). Йертен [83] сконструировал прибор, позволяющий устранить конвекцию зоны белка в свободном растворе путем вращения горизонтальной кварцевой трубки, в которой проводят электрофорез вокруг ее продольной оси (рис. 3.2). Разделяемые зоны наблюдают путем оптического сканирования этой трубки. Кацмпулас [79] при изучении кинетики электрофореза применил градиенты плотности в вертикальных кварцевых колонках с последующим многократным сканированием (рис. 3.3). В сконструированном Хэннигом и др. [84] приборе для аналитического электрофореза в свободном потоке стабилизация достигается при помощи капиллярного зазора между пластинами, которые находятся в высоковольтном электрическом поле, перпендикулярном ламинарному потоку буфера (рис. 3.4). Колин [85] применил остроумный метод стабилизации зон в электрофорезе с «бесконечной лентой» жидкости: под действием электромагнитных сил жидкость вращается в кольцевой ячейке, в то время как заряженные частицы движутся в электрическом поле по спирали (рис. 3.5).

3.3.3. Аппаратура для аналитического разделения на носителях различного типа

Типы аппаратуры, применяемой при электрофорезе на таких носителях, как бумага, мембраны из ацетата целлюлозы, агара, крахмал и полиакриламидный гель, очень просты (рис. 3.6). Бумага и мембраны из ацетата целлюлозы поддерживаются двумя стержнями, агарозой и гелем крахмала покрывают стеклянные пластинки, а полиакриламидный гель помещают в стеклянные трубки или между двумя пластинками. Образец наносят на носитель, который контактирует с буферными растворами, находящимися в сосудах с положительным и отрицательным электродами. После электрофоретического разделения компоненты можно сделать видимыми при помощи специфических

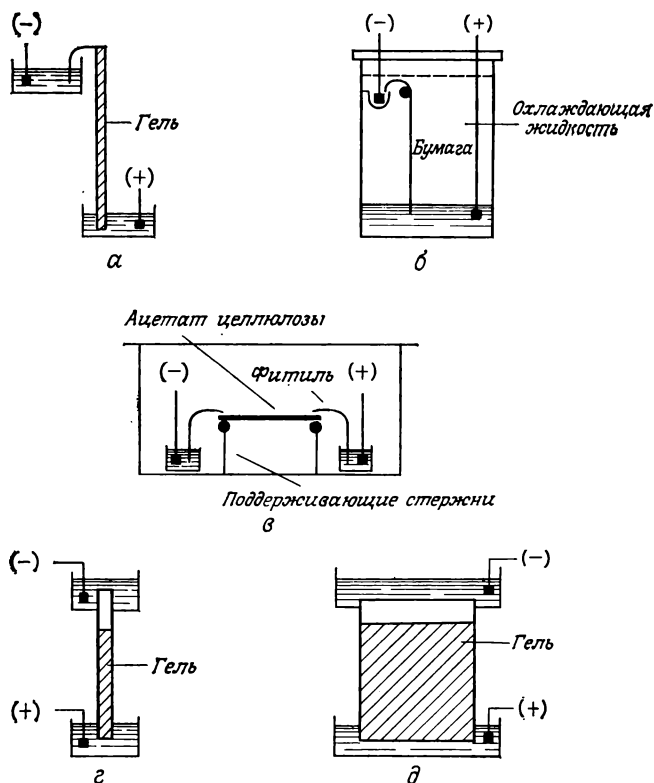


Рис. 3.6. Схемы приборов для электрофореза на различных носителях.

а — крахмальный гель; *б* — бумага (высоковольтный электрофорез); *в* — бумага, ацетат целлюлозы или агароза; *г* — полиакриламидный гель в трубке (стержне); *д* — полиакриламидный гель в блоке.

методов окрашивания, иммунодиффузии, авторадиграфии и др. Благодаря своей простоте эти методы нашли широкое применение в биологических и клинических лабораториях.

3.3.4. Аппаратура для препаративного разделения в жидких средах

Конструкции аппаратов для препаративного и аналитического разделения ничем принципиально не различаются, только аппараты первого типа, естественно, имеют больший объем и снабжены устройствами для эффективного охлаждения и сбора фракций. Препаративный электрофорез в жидкой среде можно проводить как в непрерывном, так и в периодическом режиме.

В непрерывном режиме осуществляют, например, электрофорез в свободном потоке [72] и СТАФЛО-электрофорез [86]. Крупномасштабный электрофорез белков можно также непрерывно проводить в двух вертикальных концентрических цилиндрах (рис. 3.7). Наружный цилиндр вращается, чтобы обеспечить стабилизацию перемещающихся вверх заряженных частиц. Сосуды с электродами расположены перпендикулярно направлению потока, и поэтому электрическое поле отклоняет разделяе-

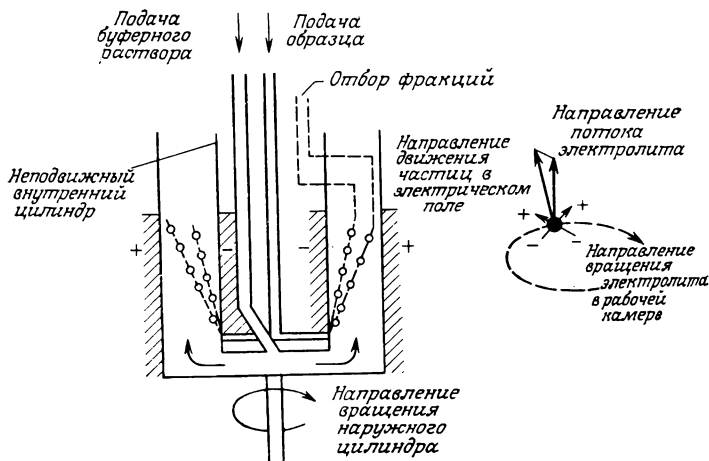


Рис. 3.7. Схема прибора для препаративного проточного электрофореза.

мые вещества, которые затем через отверстия в верхней части аппарата поступают в сосуды для сбора фракций.

Стабилизация разделяемых компонентов при работе в периодическом режиме достигается при помощи градиента некоего вещества (сахарозы, фикоλλα и др.), которое соприкасается с электролитом, находящимся в электродных сосудах (рис. 3.8). Градиент плотности формируют над слоем концентрированного раствора вещества, используемого для создания градиента. Этот слой выполняет роль своего рода прокладки. Охлаждение осуществляется и снаружи (водяная рубашка), и изнутри (охлаждающий цилиндр) циркулирующей водой, температура которой составляет 4 °С. Таким образом, поперечное сечение колонки имеет форму кольца, охлаждаемого с обеих сторон. По окончании электрофореза фракции отбирают, выпуская содержимое колонки через отверстие в ее нижней части или высасывая его при помощи насоса через капиллярную трубку в центре охлаждающего цилиндра [87].

3.3.5. Электролитические системы

Четыре вышеупомянутые электролитические системы (разд. 3.3.1) применяют не только для электрофоретического разделения белков, но также с целью охарактеризовать белки, т. е. определить изоэлектрическую точку, молекулярную массу и суммарный электрический заряд при данных значениях рН и ионной силы.

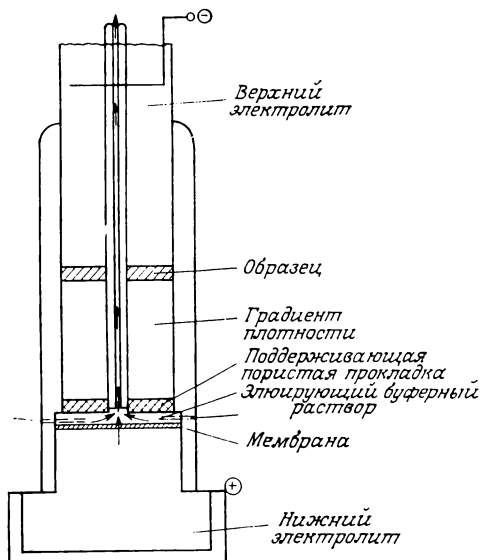


Рис. 3.8. Схема типичного прибора для препаративного электрофореза в градиенте плотности.

Зависимость подвижности белка от рН определяет его поведение в процессе электрофореза, осуществляемого одним из описанных методов. Если при заданном значении рН сумма всех положительных зарядов равна сумме всех отрицательных зарядов и общий заряд, следовательно, равен нулю, белок находится в своей изоэлектрической точке. При любом другом значении рН общий заряд белка отличается от нуля, и в зависимости от знака заряда белок перемещается к отрицательному или положительному электроду. Подбирая соответствующие буферные растворы, можно добиться того, чтобы белки перемещались с различной скоростью при данных значениях рН (зонный электрофорез при постоянном значении рН), могли располагаться друг за другом в последовательности, определяемой их подвиж-

ностями (изотахофорез), или фокусировались в их изоэлектрических точках (изоэлектрическое фокусирование). Объединяя перечисленные выше методы в двумерном электрофорезе, можно значительно улучшить разрешающую способность. При разделении белков, молекулы которых имеют различные размеры, можно, кроме того, использовать молекулярно-ситовые свойства пористых гелей. Если белки обработать ионным детергентом, например додецилсульфатом натрия, то образуются комплексы, для которых характерно постоянство отношения заряда к массе входящего в их состав белка, что позволяет провести разделение белков исключительно в соответствии с размерами их молекул.

3.3.6. Зонный электрофорез при постоянном значении pH

Термином «зонный электрофорез при постоянном значении pH » называют метод разделения при одинаковом значении pH во всей электролитической системе, т. е. в резервуарах с анодным и катодным буферами, в зоне разделения и в образце (рис.

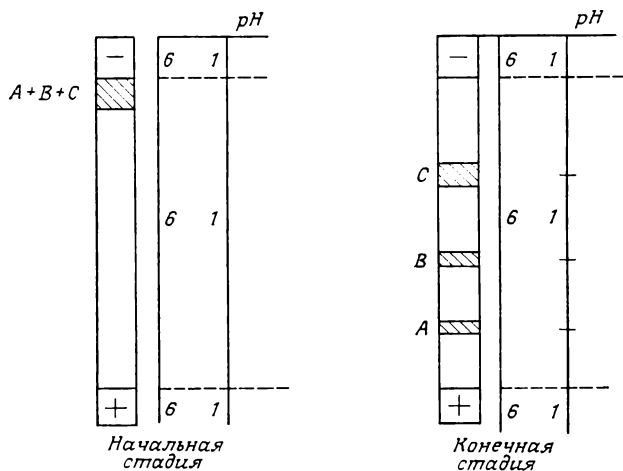


Рис. 3.9. Расположение зон на различных стадиях зонного электрофореза ($A+B+C$ — компоненты образца).

3.9). В процессе электрофореза pH также не меняется. Поскольку общие величины зарядов белков и, следовательно, их электрофоретические подвижности при заданном значении pH значительно различаются, белки лучше всего разделять именно в таких системах. Зонный электрофорез предпочтительнее проводить в щелочных буферных растворах, так как большинство

белков максимально заряжено при высоких значениях рН. В работе [67] описан ряд рекомендуемых буферных систем с точно установленными величинами рН, ионной силы и проводимости. Эти буферные растворы можно использовать в диапазоне рН от 2,5 до 11 с интервалами в 0,5 ед. рН.

Носителями в данном случае чаще всего служат ацетат целлюлозы [26] и гели агарозы [4]. Разрешающая способность таких систем очень низка из-за чрезмерного диффузионного размывания зон. Применение в качестве носителя крахмального или полиакриламидного геля значительно повышает разрешающую способность прежде всего благодаря молекулярно-ситовому эффекту. Иммуноэлектрофорез [56] является одной из разновидностей зонного электрофореза при постоянном значении рН: после разделения белки диффундируют навстречу специфическим антителам и их взаимодействие приводит к образованию дуг иммунопреципитации. Полуколичественную оценку каждого антигенного компонента можно выполнить методом электроиммунодиффузии [57]. После разделения методом зонного электрофореза антигенные белки электрофоретически мигрируют в направлении, перпендикулярном прежнему пути, в гель, содержащий равномерно распределенные антитела. Высота образующихся пиков преципитации является мерой относительной концентрации белков в смеси.

3.3.7. Изотахофорез

Изотахофорез — метод разделения белков на ряд последовательных зон в соответствии с их электрофоретической подвижностью [58, 61, 62, 65]. Под действием постоянного тока зоны белков располагаются непосредственно друг за другом, как бы складываются в «стопку». В присутствии противоионов такие стопки из зон белка, имеющих различные значения рН, образуются между ведущими и замыкающими ионами. Скорость, с которой перемещаются зоны белка, и распределение концентраций ионов между их границами определяются концентрацией ведущих ионов. Объясняется это следующим: скорость, с которой мигрирует замыкающий ион, зависит от скорости миграции ведущего иона, т. е. ион с самой малой собственной подвижностью перемещается с такой же скоростью, как и ион с самой высокой подвижностью, вследствие увеличения градиента напряжения в направлении, обратном направлению миграции. Внутри стопки белки концентрируются в узких зонах, так как концентрация ионов на каждой стороне движущейся границы фиксирована согласно принципу Кольрауша [65]. Разделение зон белка достигается при помощи разделителей («спейсеров»), т. е. веществ, ионы которых обладают промежу-

точной по сравнению с исследуемыми ионами подвижностью. В качестве «спейсеров» для изотахофореза успешно применяются амфолиты [58].

Как схематически показано на рис. 3.10, образец белка помещают между верхней и нижней буферными системами. Верхний буфер (фаза альфа) содержит замыкающий ион (компонент 1) и противоион (компонент 6). Нижний буфер (фаза бета) содержит ведущий ион (компонент 2) и противоион (компо-

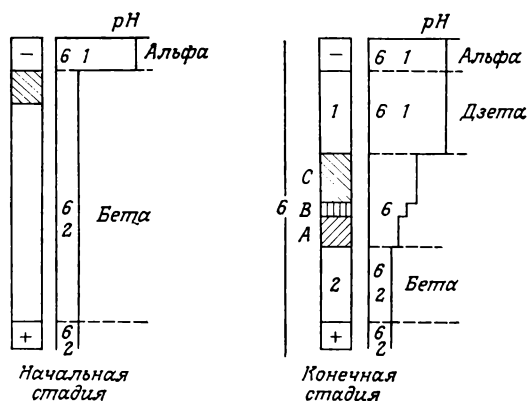


Рис. 3.10. Расположение зон на различных стадиях изотахофореза ($A+B+C$ — компоненты образца; 1 — замыкающий ион, 2 — ведущий ион, 6 — противоион).

нент 6). Компонентом 1 может быть однозарядный ион слабого электролита, а компонентом 2 — любой одно-, двух- или многозарядный ион слабого электролита. Общий для всех фаз компонент 6 может быть ионом как сильного, так и слабого электролита. Образец растворяют в нижнем буферном растворе вместе со «спейсерами», если таковые используются. Чтобы не тормозить миграции белков, в качестве носителя обычно выбирают полиакриламидный гель с низкой концентрацией. При установлении равновесия после приложения электрического поля все компоненты образца располагаются в виде стопки зон между фазами бета и дзета. Эта стопка слоев мигрирует как движущийся градиент рН постоянной ширины. Фазы альфа и дзета идентичны по составу, но их можно распознать, поскольку фаза дзета образуется внутри гелевой матрицы, где подвижности компонентов 1 и 6 могут несколько отличаться от их подвижностей в свободном растворе. Изотахофорез в своем наиболее распространенном виде используется в диск-электрофорезе на стадии концентрирования образца [66, 67].

на, образующаяся в результате концентрирования; б) слабое размывание зон за счет диффузии благодаря малому размеру пор разделяющего геля; в) разделение молекул происходит не только по зарядам, но и по размерам (гель играет роль своего рода сита). Действительно, если использовать гель с известным размером пор, то можно определить размеры белковых молекул [88].

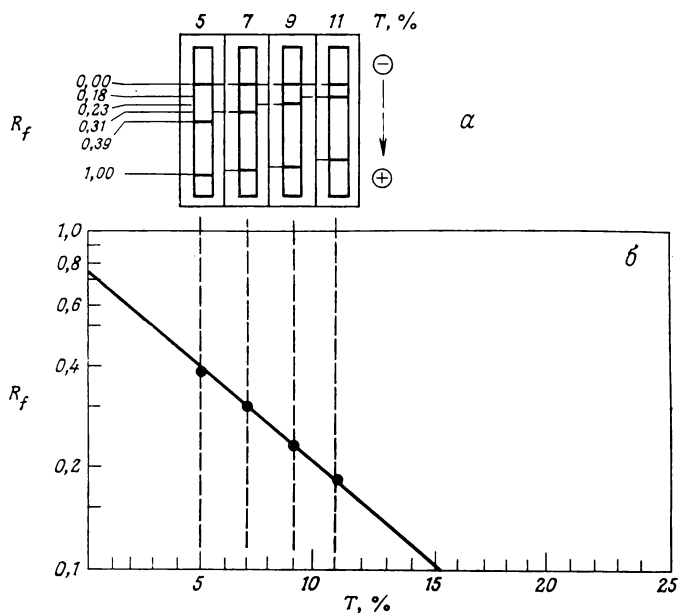


Рис. 3.12. Схема определения подвижности белка R_f относительно стандарта (краситель, $R_f=1$) при различных концентрациях акриламида ($T, \%$).

График зависимости $\lg R_f$ от T ; K_R — коэффициент удерживания белка, который определяют графически.

3.3.9. Электрофоретическое удерживание в полиакриламидных гелях

Положение фронта (границы пи/ламбда) при многофазном зонном электрофорезе можно наблюдать визуально, если использовать красители. Величина относительной подвижности R_f определяется как отношение расстояния, пройденного зоной белка, к расстоянию, пройденному красителем. Коэффициенты удерживания K_R нескольких белков можно определить одновременно, если приготовить гели с различной концентрацией акриламида ($T, \%$), но с постоянным относительным содержанием

сшивающего реагента (C , %). С этой целью для каждого вещества нужно построить зависимость $\lg R_f$ от T (рис. 3.12). Величина тангенса угла наклона полученной прямой соответствует коэффициенту удерживания K_R . Точка пересечения с осью ординат характеризует относительную свободную подвижность Y_0 . Эти два параметра определяют соответственно размер молекулы и ее суммарный заряд. Используя в качестве стандартов ряд глобулярных белков известного молекулярного радиуса \bar{R} , можно построить зависимость K_R от \bar{R} , которая в координатах $\sqrt{K_R} - \bar{R}$ описывается прямой. Эта калибровочная кривая позволяет по найденному значению K_R оценить радиус молекулы неизвестного глобулярного белка и, следовательно, его молекулярную массу [88]. Линейное соотношение между K_R и молекулярной массой можно также получить и для развернутых белков в форме статистического клубка (например, в растворе додецилсульфата натрия). При электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия определяют молекулярную массу диссоциированных субъединиц, а не нативного белка. Отсюда следует, что число субъединиц в молекуле белка можно оценить, сопоставляя данные электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии и в отсутствие додецилсульфата натрия.

3.4. Изоэлектрическое фокусирование

Изоэлектрической точкой (pI) белка называют величину pH , при которой его суммарный заряд равен нулю. Изоэлектрическое фокусирование включает электрофоретическую миграцию белка в условиях градиента pH , которая продолжается до тех пор, пока белок не достигнет такой области, где pH равен pI белка. Суммарный заряд белка становится равным нулю, и белок концентрируется в этой области в виде узкой зоны. Любое перемещение белка из-за диффузии в сторону от этой зоны ведет к восстановлению его электрического заряда и, следовательно, к электрофоретической миграции в обратном направлении. Итак, при изоэлектрическом фокусировании электрофоретический массоперенос и зональная диффузия совместно обуславливают стационарность процесса. Белки фокусируются в различных областях градиента pH , если их значения pI различны, и таким образом разделяются (рис. 3.13). Кроме того, pI конкретных белков можно определить непосредственно путем измерения pH в зонах фокусирования. В качестве среды для изоэлектрического фокусирования применяют градиенты плотности и полиакриламидные или гранулированные гели.

Градиент рН создают путем приложения постоянного электрического поля к смеси амфолитов-носителей (амфотерных соединений низкой молекулярной массы с близкими значениями pI). Сами амфолиты-носители фокусируются, т. е. «выстраиваются» вдоль электрического поля от анода к катоду в порядке возрастания значений pI , формируя таким образом градиент рН и обеспечивая достаточную буферную емкость и проводимость раствора. Так как суммарный заряд белка зависит от значения

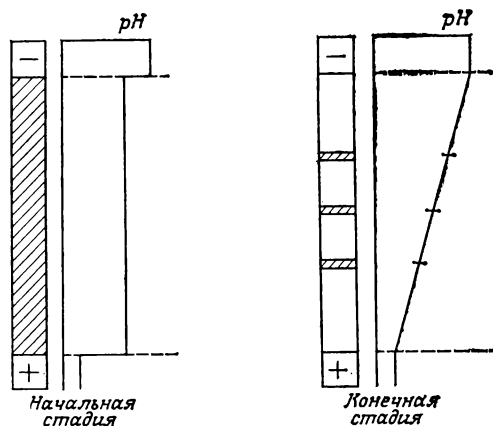


Рис. 3.13. Расположение зон на различных стадиях изоэлектрофокусирования.

рН окружающей среды, белок, помещенный в любое место градиента рН, приобретает положительный или отрицательный заряд и будет мигрировать по направлению к электроду противоположной полярности до тех пор, пока не достигнет области, где рН равен pI белка. Таким образом, при изоэлектрическом фокусировании нет необходимости вводить образец в виде очень узкой зоны.

В стационарных условиях ширина зоны фокусируемого белка зависит от коэффициента диффузии D , напряженности электрического поля E и параметра электрофокусирования p , который в свою очередь зависит от крутизны градиента рН $[d(pH)/dx]$ и наклона кривой рН—подвижность белка $[dM/d(pH)]$ при $pH=pI$, где M —электрофоретическая подвижность, а x —расстояние [93]. Стандартное отклонение σ в зоне Гаусса определяется выражением

$$\sigma = (D/pE)^{1/2} \quad (3.5)$$

где

$$p = -[dM/d(pH)] [d(pH)/dx] \quad (3.6)$$

Уравнение 3.5 показывает, что при малых значениях D и больших значениях $dM/d(pH)$, обычно характерных для белков, величины σ будут небольшими и поэтому зоны будут четко сфокусированы. Еще большего сужения зон можно добиться путем увеличения крутизны градиента pH , т. е. $d(pH)/dx$, и увеличения напряженности поля E . Однако увеличение напряженности поля нежелательно из-за выделения джоулева тепла, которое вызывает конвекционные возмущения на пути миграции белка, не говоря уже о возможной денатурации белка.

Изоэлектрическое фокусирование обладает наивысшей разрешающей способностью, когда-либо достигавшейся при разделении белков по зарядам [58—64, 92]. Этот метод позволяет разделить белки, величины pI которых различаются всего на 0,01 ед. pH . Иногда для такого разделения бывает достаточно различия между двумя структурами на одну заряженную группу. При помощи метода изоэлектрофокусирования можно также обнаружить другие различия в зарядах, которые, строго говоря, не связаны с макроскопической негомогенностью белков. Вот некоторые из факторов, обуславливающих такие различия: посттрансляционная модификация первичной структуры (например, дезамидирование), связывание лигандов, химическая модификация, вариации в небелковых компонентах, например липидах, углеводах и других простетических группах, ассоциация и диссоциация, изменения окислительно-восстановительного состояния металлоферментов. Если при анализе картины изоэлектрофокусирования иметь в виду эти факторы, то полученные данные могут приобрести дополнительную ценность, поскольку в принципе они позволяют обнаружить микрогетерогенность белковых структур. В настоящее время метод изоэлектрического фокусирования применяют в сочетании с другими электрофоретическими методами, например в сочетании с электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, для получения двумерных карт разделяемых компонентов. В одном направлении производят разделение белков в соответствии со значениями их pI , а в другом — в соответствии с размерами их молекул, т. е. в соответствии с их молекулярными массами. При помощи этих методов можно охарактеризовать смеси, содержащие тысячи белков [94]. Еще несколько лет тому назад разделение с таким высоким разрешением было просто невысказимо, а в настоящее время этот метод анализа находит все более широкое и все более успешное применение в различных биохимических исследованиях.

Литература

1. *Ackers G. K.* Biochemistry, **3**, 723 (1964).
2. *Joustra M.* — In: Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles./Ed. Gerritsen T. New York: Wiley-Interscience, 1969, p. 183.
3. *Determann H.* Gel Chromatography. 2nd Edn. New York: Springer, 1969.
4. *Fisher L.* An Introduction to Gel Chromatography. New York: Elsevier, 1969.
5. *Hjerten S.* — In: New Techniques in Amino Acid, Peptide, and Protein Analysis./Eds. Niederwieser A., Pataki G. MI, Ann Arbor: Ann Arbor Sci. Publ., 1971.
6. *Fish W. W., Reynolds J. A., Tanford C. J.* Biol. Chem., **245**, 5166 (1970).
7. *Laurent T. C., Killander J. J.* Chromatogr., **14**, 317 (1964).
8. *Ackers G. K.* — In: The Proteins. 3rd Edn. Vol. 1./Eds. Neurath H., Hill R. L. New York: Academic Press, 1975, p. 2.
9. *Ackers G. K.* — In: Method of Protein Separation. Vol. 2./Ed. Catsim-poolas N. New York: Plenum., 1976, p. 1.
10. *Ackers G. K.* Methods Enzymol., **27**, 441 (1973).
11. *Porath J.* Pure Appl. Chem., **6**, 233 (1963).
12. *Ackers G. K. J.* Biol. Chem., **242**, 3237 (1967).
13. *Ostrowski W., Wasyl Z.* Biochim. Biophys. Acta, **181**, 479 (1969).
14. *Rodbard D.* — In: Methods of Protein Separation. Vol. 2./Ed. Catsim-poolas N. New York: Plenum, 1976, p. 145.
15. *Rodbard D.* — In: Methods of Protein Separation. Vol. 2./Ed. Catsim-poolas N. New York: Plenum, 1976, p. 181.
16. *Catsimpoolas N., Kenney J. J.* Chromatogr., **64**, 77 (1972).
17. *Catsimpoolas N., Kenney J. J.* Chromatogr., **71**, 573 (1972).
18. *Catsimpoolas N.* Anal. Biochem., **61**, 101 (1974).
19. *Sosa J. M.* Anal. Chem., **52**, 910 (1980).
20. *Peterson E. A.* Cellulosic Ion Exchangers. Amsterdam: North-Holland, 1970.
21. *Peterson E. A., Sober H. A.* Methods Enzymol., **5**, 3 (1962).
22. *Peterson E. A., Sober H. A.* — In: Biochemical Preparations./Ed. Meister A. New York: Wiley, 1961, pp. 8, 39, 43, 45, 47.
23. *Cuatrecasas P.* — In: Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports./Ed. Stark G. R. New York: Academic Press, 1971, p. 79.
24. *Cuatrecasas P., Anfinsen C. B.* Ann. Rev. Biochem., **40**, 259 (1971).
25. *Porath J., Kristiansen T.* — In: The Proteins. 3rd Edn. Vol. 1./Eds. Neurath H., Hill R. L., Boeder C.-L. New York: Academic Press, 1975, p. 95.
26. *Lowe C. R., Dean P. D. G.* Affinity Chromatography. New York: Wiley-Interscience, 1974.
27. *Parikh I., Cuatrecasas P.* — In: Methods of Protein Separation. Vol. 1./Ed. Catsimpoolas N. New York: Plenum, 1975, p. 255.
28. *Axén R., Porath J., Ernback S.* Nature (London), **214**, 1302 (1976).
29. *Cuatrecasas P. J.* Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
30. *Lowe C. R., Harvey M. J., Craven D. B., Dean P. D. G.* Biochem. J., **133**, 499 (1973).
31. *Hofstee B. H. J.* Anal. Biochem., **52**, 430 (1973).
32. *Zaidenzaig Z., Er-El. Y., Shaltiel S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 383 (1972).
33. *Hjertén S. J.* Chromatogr., **87**, 325 (1973).
34. *Hjertén S.* — In: Methods of Protein Separation. Vol. 2./Ed. Catsum-poolas N. New York: Plenum, 1976, p. 233.
35. *Tiselius A., Hjerten S., Levin O.* Arch. Biochem. Biophys., **65**, 326 (1956).
36. *Hayek E., Stadelmann W.* Angew. Chem., **67**, 326 (1956).
37. *Anacker W., Stoy V.* Biochem. Z., **330**, 141 (1958).
38. *Bernardi G., Giro M.-G., Gaillard C.* Biochim. Biophys. Acta, **278**, 409 (1972).

39. Regnier F. E., Gooding K. M. *Anal. Biochem.*, **103**, 1 (1980).
40. Kirkland J. J. *J. Chromatogr.*, **125**, 231 (1976).
41. Kirkland J. J., Antle P. E. *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 137 (1977).
42. Unger K., Schick-Kalb J., Krebs K.-F. *J. Chromatogr.*, **83**, 5 (1973).
43. Regnier F. E., Noel R. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 316 (1976).
44. Kato Y., Komiya K., Sawada Y., Sasaki H., Hashimoto T. *J. Chromatogr.*, **190**, 305 (1980).
45. Chang S. H., Gooding K. M., Regnier F. E. *J. Chromatogr.*, **125**, 103 (1976).
46. Mikeš O., Štrop P., Zbrožek J., Čoupek J. *J. Chromatogr.*, **119**, 339 (1976).
47. Ohlson S., Hansson L., Larsson P.-O., Mosbach K. *FEBS Lett.*, **93**, 5 (1978).
48. Bier M. (Editor). *Electrophoresis*. Vol. 1. New York: Academic Press, 1959.
49. Bloemendal H. *Zone Electrophoresis in Blocks and Columns*. Amsterdam: Elsevier, 1963.
50. Smith I. (Editor). *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*. Vol. 2. London: Heinemann, 1968.
51. Wieme R. J. *Agar Gel Electrophoresis*. Amsterdam: Elsevier, 1965.
52. Shaw D. J. *Electrophoresis*. New York: Academic Press, 1969.
53. Cawley L. P. *Electrophoresis and Immuno-electrophoresis*. MA, Boston. Little, Brown, 1969.
54. Whitaker J. R. *Electrophoresis in Stabilizing Media*. New York: Academic Press, 1967.
55. Sargent J. R. *Methods in Zone Electrophoresis*. Poole: British Drug Houses, 1965.
56. Grabar P., Burtin P. (Editors). *Immuno-electrophoretic Analysis*, Amsterdam: Elsevier, 1964.
57. Laurell C.-B. (Editor). *Electrophoretic and Electro-Immunochemical Analysis of Proteins*, Scand. J. Lab. Invest. Vol. 29, Suppl. 124, 1972.
58. Catsimpoalas (Editor). *Isoelectric Focusing and Isotachoelectrophoresis*. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 209, 1973.
59. Catsimpoalas N. (Editor). *Isoelectric Focusing*. New York: Academic Press, 1976.
60. Arbutnot J. P., Beeley J. A. (Editor). *Isoelectric Focusing*. London, Butterworths, 1975.
61. Righetti P. G. (Editor). *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachophoresis*. Amsterdam: North-Holland, 1975.
62. Radola B. J., Graesslin D. (Editors). *Electrofocusing and Isotachophoresis*. Berlin: De Gruyter, 1977.
63. Allen R. C., Maurer H. R. (Editors). *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*. Berlin: De Gruyter, 1974.
64. Catsimpoalas N., Drysdale J. W. (Editors). *Biological and Biomedical Applications of Isoelectric Focusing*. New York: Plenum, 1977.
65. Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M. *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation, and Applications*. Amsterdam: Elsevier, 1976.
66. Ornstein L. — In: *Gel Electrophoresis*. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 121/2, 1964, p. 321.
67. Chrambach A., Jovin T. M., Svendsen P. J., Rodbard D. — In: *Methods of Protein Separation*. Vol. 2./Ed. Catsimpoalas N. New York: Plenum, 1976, p. 27.
68. Catsimpoalas N. — In: *Electrophoresis '79*./Ed. Radola B. J. Berlin, De Gruyter, 1980, p. 503.
69. Chin H. P. *Cellulose Acetate Electrophoresis: Techniques and Applications*. MI. Ann Arbor: Ann Arbor Sci. Publ., 1970.
70. Gordon A. H. *Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels*. Amsterdam: Elsevier, 1969.
71. Maurer H. R. *Disc Electrophoresis*. New York: De Gruyter, 1971.

72. *Hanning K.* — In: *Electrophoresis*. Vol. 2/Ed. Bier M. New York: Academic Press, 1967, p. 423.
73. *Hjerten S.* *Free Zone Electrophoresis*. Uppsala, Almqvist and Wiksells, 1967.
74. *Kolin A.* — In: *Methods of Cell Separation*. Vol. 2./Ed. Catsimpooolas N. New York: Plenum, 1979, p. 93.
75. *Thomson A. R., Mattock P., Aitchison G. A.* — In: *Proc. Intern. Workshop Technol. Protein. Separ. Improvement Blood Plasma Fract./Ed. Sandberg H. E. MD. Bethesda: DHEW Publication No. (NIH) 78—1422, 1978.*
76. *Wrigley C. W.* — In: *Isoelectric Focusing./Ed. Catsimpooolas N.* New York: Academic Press, 1976, p. 93.
77. *Catsimpooolas N.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 144 (1973).
78. *Smith B. A., Ware B. R.* — In: *Contemporary Topics in Analytical and Clinical Chemistry*. Vol. 2./Eds. Hercules D. M., Hieftje G. M. H., Snyder J. R., Evenson M. A. New York: Plenum, 1978, p. 29.
79. *Catsimpooolas N.* — In: *Methods of Protein Separation*. Vol. 1./Ed. Catsimpooolas N. New York: Plenum, 1975, p. 27.
80. *Tiselius A.* *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524 (1937).
81. *Longsworth L. G.* *Chem. Rev.*, **30**, 323 (1942).
82. *Ware B. R., Flygare W. H.* *Chem. Phys. Lett.*, **12**, 81 (1971).
83. *Hjerten S.* *Ark. Kemi.*, **13**, 151 (1958).
84. *Hanning K., Wirth H., Schindler R. K., Spiegel K.* *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 753 (1977).
85. *Kolin K.* *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **46**, 509 (1960).
86. *Tippetts R. D., Mel H. C., Nichols A. V.* — In: *Chemical Engineering in Biology and Medicine./Ed. Hershey D.* New York: Plenum, 1967, p. 505.
87. *Catsimpooolas N., Griffith A. L.* — In: *Catsimpooolas N. Methods of Cell Separation*. Vol. 1./Ed. Catsimpooolas N. New York: Plenum, 1977, p. 1.
88. *Rodbard D.* — In: *Methods of Protein Separation*. Vol. 2. Ed. Catsimpooolas N. New York: Plenum, 1976, p. 145.
89. *Weber K., Osborn M.* — In: *The Proteins*. Vol. 1./Eds. Neurath H., Hills R. L. New York: Academic Press, 1975, p. 180.
90. *Kolin A. J.* *Chem. Phys.*, **23**, 407 (1955).
91. *Svensson H.* *Acta Chem. Scand.*, **16**, 456 (1962).
92. *Vesterberg O., Svensson H.* *Acta Chem. Scand.*, **20**, 820 (1966).
93. *Rilbe H.* — In: *Isoelectric Focusing./Ed. Catsimpooolas N.* New York: Academic Press, 1976, p. 14.
94. *O'Farrel P. H. J.* *Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).

Глава 4

Липиды

Арнис Куксис

4.1. Введение

Достижения в области хроматографии позволили к настоящему времени получить обширную информацию о строении и свойствах разнообразных представителей класса липидов. В результате простое увлечение переросло за последние десятилетия в истинный интерес к химии и биохимии этих соединений. Этот интерес основывается на понимании того факта, что липиды играют важную роль в поддержании биологической структуры и функции. В настоящее время многие лаборатории занимаются изучением этих соединений как на тканевом, так и на клеточном и субклеточном уровнях. В связи с этим возникла необходимость создания методов количественного анализа микропроб, которые содержат липиды в концентрации, часто находящейся в диапазоне предельной чувствительности большинства аналитических систем. Поэтому последние разработки в области хроматографии липидов связаны с увеличением чувствительности анализа и повышением точности методов обработки экспериментальных данных. Обе цели в значительной степени были достигнуты благодаря созданию систем ГЖХ и ВЭЖХ, контролируемых микропроцессорами, что позволило полностью реализовать разрешающую способность этих методов.

ТСХ и ГЖХ являются в настоящее время наиболее общепринятыми рутинными методами, в то время как ВЭЖХ успешно применяется в тех случаях, когда возможно сочетание хорошего разрешения с чувствительным обнаружением.

Число работ, посвященных использованию этих хроматографических методов для анализа липидов, столь велико, что в рамках одной главы дать достаточно полный их обзор не представляется возможным. Поэтому мы ограничимся лишь описанием наиболее удачных рутинных методик количественного анализа различных глицеро- и сфинголипидов, а также свободных жирных кислот и простагландинов получаемых из природных источников. При обсуждении методов анализа описанных объектов мы будем ссылаться на работы, касающиеся достижений соответствующего метода или его типичных приложений. Отда-

вая дань авторам более ранних работ, опубликованных до рассматриваемого здесь периода (1975—1980 гг.), мы включили некоторые из этих работ в список литературы.

Детальное рассмотрение других аспектов хроматографии липидов читатель может найти в обзорах, посвященных конкретным хроматографическим методам (например, ТСХ [1—4], ГЖХ [5—7], ВЭЖХ [8—9]), книгах [10—13] и обзорных статьях более общего характера [14—18].

4.2. Получение экстрактов липидов

4.2.1. Экстракция липидов из тканей

Существует два основных рутинных метода, позволяющих количественно экстрагировать липиды практически всех классов как из самой ткани, так и из ее фракций.

В наиболее популярном методе, предложенном Фолчем и др. [19], экстракцию проводят смесью хлороформ — метанол (2 : 1) из расчета двадцать частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Этот метод позволяет получить достаточно высокий выход нейтральных липидов, диацилглицерофосфолипидов и сфинголипидов. Лизофосфолипиды переходят в раствор лишь частично, а более полярные кислые фосфолипиды могут теряться при промывках экстракта растворами солей и водой [20]. Однако путем проведения повторных экстракций и ограничения промывок выход лизолипидов можно повысить до количественного [21, 22].

Вторая, наиболее популярная методика экстракции липидов предложена Блаем и Дайером [23]. Эти авторы предлагают солюбилизовать липиды смесью хлороформ — метанол (1 : 1) из расчета две части смеси на одну часть ткани. Однако в этом случае, как и при экстракции по методике Фолча и др., в ходе последующих промывок экстракта водой наиболее полярные кислые фосфолипиды и лизофосфолипиды переходят в водную фазу и, таким образом, теряются. Преимущества и недостатки этих методов экстракции подробно обсуждаются в работах Нельсона [20] и Цалера и Ниггли [24]. Последние авторы считают целесообразным ввести стадию очистки первичных экстрактов.

Скотту и др. [25] удалось повысить выход полярных липидов, заменив смесь хлороформ — метанол на смесь хлороформ — 2%-ный раствор уксусной кислоты в метаноле, а Артур и Шелтави [26] применили в тех же целях смесь хлороформ — метанол — 1 М соляная кислота (4 : 2 : 3). Не исключено, что при этом плазмалогены будут потеряны, поскольку известно,

что они разрушаются во время экстракции полифосфоинозитов. Для более полного выделения последних в систему хлороформ—метанол добавляли разбавленную соляную кислоту [27]. Хансон и Лестер [28] показали, что слабощелочные смеси, например этанол—вода или этанол—вода—диэтиловый эфир, при повышенных температурах эффективно экстрагируют инозитсодержащие фосфолипиды из интактных клеток дрожжей.

Простагландины и другие окисленные жирные кислоты эффективно экстрагируют диэтиловым эфиром, после чего раствор подкисляют разбавленной лимонной или муравьиной кислотой [29, 30]. При использовании органических кислот отпадает необходимость в многократной промывке экстрактов водой и, следовательно, сводится к минимуму вероятность потери полярных простагландинов. Мин и сотр. [31] извлекали простагландины из 1 М фосфатного буферного раствора (рН 3,0) смесью бензол—дихлорметан (9:1). Пейс-Ассиак и др. [32] использовали систему хлороформ—метанол как начальную экстрагирующую смесь для выделения простагландинов из гомогенатов тканей.

Отфильтрованный первичный липидный экстракт может содержать от 25 до 75% нелипидных примесей. Однако метанольно-хлороформный экстракт можно в значительной степени освободить от веществ нелипидной природы с помощью хроматографии на колонке с декстрановым гелем [33]. Критический анализ этой процедуры проведен в обзоре [34].

В настоящее время не существует простых и надежных способов выделения ганглиозидов из экстрактов тканей, а в основе большинства существующих лежит методика Фолча и сотрудников, в соответствии с которой все липиды экстрагируют смесью хлороформ—метанол, затем ганглиозиды переводят в водную фазу и полученный водный раствор диализуют. Ранделл и Пеннок [35] рассмотрели множество модификаций подобных рутинных процедур и предложили усовершенствованную простую методику экстракции ганглиозидов. Она основана на существующих способах экстракции и включает стадию диализа против карбовакса или использование фильтров фирмы Millipore.

Филлипс и Приветт [36] описали новый метод количественной экстракции липидов из ткани мозга смесью хлороформ—метанол, который исключает этап вторичной очистки липидного экстракта с помощью хроматографии на декстрановых гелях или промывку водой органического экстракта. Нелипидные вещества, которые обычно загрязняют метанольно-хлороформный экстракт, предварительно экстрагируют разбавленной 0,25%-ной уксусной кислотой. В результате последующей экстракции обработанной таким образом ткани 40 объемами смеси хлороформ—

метанол удается выделить примерно 97% липидов. В сокращенном варианте проводят третью экстракцию, в результате которой получают еще 1% липидов, и на этом вся процедура заканчивается. В обычном варианте остаток липидов выделяют обработкой ткани 1 М HCl с последующими двумя экстракциями — сначала 40 объемами смеси хлороформ — этанол (1:2), затем 40 объемами метанола. Описанным методом удалось полностью экстрагировать липиды, в том числе и ганглиозиды из ткани мозга свиньи, причем экстракт не содержал веществ нелипидной природы.

При экстракции липидов из тканей растений гидролитические ферменты, в частности фосфолипазу D, следует денатурировать нагреванием. Под действием этих ферментов в присутствии воды из фосфатидилхолина образуются фосфатидная кислота и холин [37, 38], а при экстракции свежей ткани метанолом или этанолом — фосфатидилметанол и фосфатидилэтанол соответственно [38, 39]. Однако Филлипс и Приветт [40] экстрагировали липиды из незрелых бобов без каких-либо осложнений. Их метод включал предварительную обработку незрелых бобов теплой 0,25%-ной уксусной кислотой с последующей экстракцией смесью хлороформ — метанол. Эта методика дает возможность полностью выделить липиды, включая сильнополярные гликолипиды, не содержащие примеси нелипидных соединений.

Результатом действия липолитических ферментов, высвобождающихся после гибели клеток [41, 42] или их разрушения замораживанием [43], является повышение количества свободных жирных кислот и лизофосфолипидов в экстракте ткани. Замораживание и размельчение ткани при температуре сухого льда [41, 44], по-видимому, снижают скорость липолиза и образования свободных жирных кислот. Тем не менее предложенная Филлипсом и Приветтом [40] обработка растительных тканей разбавленной уксусной кислотой может оказаться весьма полезной и при экстракции липидов из животных тканей.

4.2.2. Элюирование липидов с адсорбентов

При препаративном выделении отдельные группы липидов обычно элюируют с адсорбента той системой растворителей, которая использовалась для их хроматографического разделения. Поскольку такой процесс извлечения вещества обычно предусматривает удаление растворителя путем испарения, то не все системы растворителей одинаково удобны в этих случаях.

Все нейтральные липиды можно элюировать с силикагеля хлороформом, содержащим некоторое количество метанола. Эту систему используют наиболее часто [16, 42], а чистый хлоро-

форм [45], диэтиловый эфир [46], смеси диэтиловый эфир — метанол (4:1) [16] и хлороформ — метанол (9:1) [45, 47] применяют в зависимости от природы выделенного нейтрального липида.

Диацилглицерины можно экстрагировать смесью хлороформ — метанол — вода — 28%-ный раствор аммиака (100:50:6:1) [48], для выделения ганглиозидов применяют смесь метанол — хлороформ — (2:1) [49]. При выделении фосфолипидов обычно используют систему хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода в соотношениях 50:39:1:10 [50], 25:15:4:2 [51] или 49:49:2:1 [28], а также систему хлороформ — метанол — муравьиная кислота (1:1:2) [52]. При элюировании нейтральных и полярных липидов с силикагеля, пропитанного карбонатом натрия, ацетатом магния, щавелевой или борной кислотой, никаких дополнительных затруднений не возникает. А при использовании силикагеля, пропитанного нитратом серебра, к элюирующим растворителям необходимо добавить несколько капель разбавленной (1,5 М) соляной кислоты, чтобы осадить соли серебра [53].

4.2.3. Меры предосторожности, необходимые при работе с образцами липидов

Поскольку большинство липидов содержит жирные кислоты с одной и более двойными связями, определенные меры предосторожности при работе с образцом и при его хранении следует соблюдать, с тем чтобы избежать аутоокисления. Его можно свести к минимуму, если работать с растворителями, из которых предварительно удален кислород, и все манипуляции с пробой выполнять в атмосфере азота [42]. Очищенные экстракты липидов следует хранить в плотно закрытых флаконах при низких температурах (-20°C и ниже) в присутствии инертных растворителей и газов и не слишком долго [48, 54]. Можно применять антиоксиданты, например 2,6-ди-*трет*-бутил-*п*-крезол, который даже в концентрации менее 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов [55]. Этот антиоксидант легко удалить хроматографически [34], однако следует помнить, что при ГЖХ на большинстве носителей его время элюирования совпадает с временем элюирования метилмиристата [48].

Следует также учитывать, что даже при -20°C при длительном хранении образцы тканей могут под действием ферментов расщепляться [43]. И наконец, в образцы не должны попадать липиды и другие примеси из растворителей, реагентов или используемого оборудования.

4.3. Разделение липидов различных классов

Все животные и растительные ткани содержат такие сложные смеси липидов, что выделить и идентифицировать все компоненты этих смесей каким-либо одним аналитическим методом практически невозможно, и достичь этой цели можно, только объединяя несколько методов. Предварительное разделение липидов на группы, состоящие из соединений двух или трех хорошо охарактеризованных классов, облегчает последующее разделение смеси на индивидуальные компоненты. Этот прием сейчас широко используется в тех случаях, когда исследователь располагает достаточным запасом времени и достаточным для проведения такого последовательного анализа количеством вещества. В настоящее время существует несколько очень хороших систем, включающих колоночную и тонкослойную хроматографию, которые позволяют выполнить этот анализ.

4.3.1. Разделение полярных и неполярных липидов

Разделение полярных и неполярных липидов обычно выполняют методом адсорбционной или распределительной хроматографии. При этом, как правило, фосфолипиды отделяют от нейтральных липидов и свободных жирных кислот. Если в исходной смеси присутствуют гликолипиды, их обнаруживают во фракциях, содержащих липиды промежуточной полярности.

4.3.1.1. Колоночная хроматография

Для предварительного отделения первичного экстракта липидов в настоящее время наиболее часто используется хроматография на колонках с кремниевой кислотой по методу Бергстрема [56] и Раузера с соавт. [57, 58]. Нейтральные липиды при этом элюируют с колонки хлороформом, гликолипиды — ацетоном, а фосфолипиды — метанолом. Этот метод достаточно эффективен при разделении липидов первичного экстракта тканей растений [59—61], микроорганизмов [62—64] и животных [65—71]. Позднее в некоторых, особых, случаях в него были внесены незначительные изменения. Так, гликолипиды было предложено [72, 73] элюировать смесью ацетон—метанол (9:1), а не ацетоном, а триглицериды — гексаном [74, 75]. Руни и др. [76] и Нардон и др. [77] элюировали фосфолипиды смесью хлороформ—метанол (1:9) вместо метанола. Многим авторам удалось получить очищенную ацетоновую фракцию гликолипидов [78—83]. Авторы работ [84, 85] выделяли фракцию плазмалогенов из первичных экстрактов липидов на микроколонках с кремниевой кислотой. Процедура выделения гликолипидов с по-

мощью хроматографии на колонке с флоризилом детально описана в работе [12].

Другим распространенным методом разделения неполярных и полярных липидов является анионообменная хроматография на DEAE- или TEAE-целлюлозе. Роузер с соавт. [57, 58] и Нельсон [20] детально изучили практические аспекты анионообменной хроматографии липидов, в частности методику заполнения колонки и выбора растворителя. Они показали, что нейтральные липиды можно элюировать хлороформом, а холинсодержащие фосфолипиды, цереброзиды, гликоциалолипиды — смесью хлороформ — метанол (9:1). Смесью хлороформ — метанол (2:1), содержащей 1%-ную уксусную кислоту, элюируют фосфатидилэтанолamines, а уксусной кислотой — фосфатидилсерин. Для элюирования кислых фосфолипидов используют смесь хлороформ — метанол (4:1), содержащую 0,1 М аммоний-ацетатный буфер. Фракцию церамидполигексозидов можно получить достаточно чистой, если провести элюирование смесью хлороформ — метанол (2:1), а затем удалить фосфатидилхолины и сфингомиелины. Описанный метод использован во многих работах, как современных [86, 87], так и более ранних [12].

Очень хорошее разделение малых количеств полярных и неполярных липидов удалось осуществить методом ВЭЖХ на обращенной [89] и нормальной [88] фазе. Препаративный вариант данного метода описан в работе [90].

4.3.1.2. Тонкослойная хроматография

Небольшие образцы липидов достаточно удобно разделять на полярные и неполярные методом ТСХ [14—17, 91]. В системах растворителей, предназначенных для ТСХ фосфолипидов, нейтральные липиды мигрируют практически с фронтом растворителя, а в элюирующих системах, используемых для ТСХ нейтральных липидов, фосфолипиды и другие полярные липиды остаются на старте. Интересующие исследователя соединения после проведения хроматографии можно элюировать с адсорбента подходящей смесью растворителей. Обычно любая элюирующая система, пригодная для ТСХ полярных липидов, пригодна также для элюирования нейтральных липидов, но не наоборот. На практике для элюирования с адсорбента выбирают такую систему растворителей, компоненты которой более летучи. Неполярные липиды чаще всего элюируют следующими системами растворителей: хлороформ — метанол — вода (65:25:4) [92, 93] и хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:7:1) [34, 58], а полярные липиды — смесями легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир (в соотношении от 7:3 до 9:1) [58, 94], легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир —

уксусная кислота (80:20:1) [51, 95], гептан — изопропиловый эфир — уксусная кислота (60:40:3) [96].

Однако ТСХ не является самым подходящим методом извлечения гликолипидов из первичного экстракта липидов. В системах растворителей для ТСХ нейтральных липидов гликолипиды остаются на старте, а в системах растворителей для ТСХ полярных липидов они мигрируют вместе с соединениями, входящими в группу фосфолипидов. Тем не менее Витиелло и Дзанетта [97] удалось получить очищенную фракцию галактолипидов из первичного экстракта липидов с помощью ТСХ. В работах Фишера с сотр. [98, 99] можно найти описание различных систем для ТСХ гликолипидов и глицерофосфолипидов.

4.3.2. Выделение неполярных липидов различных классов

Нейтральные липиды и свободные жирные кислоты можно разделить на соединения, принадлежащие к различным классам, с помощью модификации хроматографических систем, предназначенных для разделения неполярных и полярных липидов. Обычно в этих целях применяют ТСХ, однако достаточно часто используют и адсорбционную, и распределительную колоночную хроматографии, особенно если требуется разделить большие количества вещества.

4.3.2.1. Колоночная хроматография

Разделение нейтральных липидов на соединения, принадлежащие к различным классам, достигается обычно с помощью адсорбционной колоночной хроматографии на таких адсорбентах, как кремниевая кислота или флоризил. В работе [100] подробно описано разделение нейтральных липидов на колонках с этими сорбентами и отмечены некоторые небольшие различия, которые можно использовать на практике, в хроматографических свойствах кремниевой кислоты и флоризила. При разделении на флоризиле и кремниевой кислоте очередность элюирования различных классов нейтральных липидов примерно одинакова, но время удерживания моноацетилглицеринов и свободных жирных кислот на колонках с флоризилом несколько больше, чем на колонках с кремниевой кислотой. Используя градиентное элюирование (линейный градиент диэтилового эфира в гексане), нейтральные липиды можно разделить на соединения типа углеводов (100%-ный гексан), эфиры холестерина и воски (1%-ный диэтиловый эфир в гексане), триацилглицерины (5%-ный диэтиловый эфир), свободные жирные кислоты (18%-ный диэтиловый эфир), свободный холестерин (15%-ный диэтиловый эфир), диацилглицерины (15%-ный диэтиловый эфир) и моно-

ацилглицерины (100%-ный диэтиловый эфир). При хроматографии на кремниевой кислоте сложные эфиры холестерина элюируются вместе с восками [101], однако их можно разделить на колонке с оксидом магния [102, 103]. Время удерживания на колонке с кремниевой кислотой свободного холестерина близко к времени удерживания X-1,2-диацилглицеринов, что может приводить к частичному перекрыванию зон, соответствующих этим соединениям. Поэтому их дальнейшее разделение проводят на колонке с кремниевой кислотой, содержащей борную кислоту [104]. Простые эфиры глицерина недостаточно отличаются по полярности от соответствующих сложных эфиров, чтобы их можно было разделить методом адсорбционной хроматографии [105]. Напротив, сложные эфиры холестерина и триацилглицерины разделить легко. Сложные эфиры холестерина элюируют 30%-ным раствором бензола в гексане, а триацилглицерины — 100%-ным бензолом [106]. Воски и триацилглицерины можно разделить, используя градиентное элюирование диэтиловым эфиром в легком петролейном эфире, на колонке с кремниевой кислотой, предварительно дезактивированной 10%-ным раствором воды в органическом растворителе [107]. При хроматографии сложных эфиров дохлола на колонке с кремниевой кислотой в работе [108] было применено двухстадийное элюирование — сначала гексаном, затем диэтиловым эфиром (градиент от 0 до 25%) в гексане.

Хотя адсорбционная хроматография позволяет разделить липиды на фракции, состоящие из соединений с одинаковым числом и типом полярных групп, на разделение влияют также длина цепи и степень насыщенности остатка жирной кислоты, присутствующей в молекуле липида. Так, на колонке с кремниевой кислотой можно разделить синтетические триацилглицерины, содержащие остатки жирных кислот с короткими и длинными цепями [19], а также триацилглицерины молочного жира, которые содержат жирные кислоты с короткой и длинной цепью [110, 111].

Наилучшее разделение триацилглицеринов молочного жира, содержащих жирные кислоты различной длины, было получено при градиентном элюировании диэтиловым эфиром (0—9%-ным раствором в гексане) [112, 113]. Присутствие ненасыщенных связей в молекуле триацилглицеринов приводит к увеличению времени удерживания при хроматографии на колонках с кремниевой кислотой, причем этот эффект более сильно выражен при элюировании менее полярными растворителями. Так, например, сквален может элюироваться после сквалана [114], а ненасыщенные эфиры холестерина — после насыщенных [115].

Моно- и диацилглицерины изомеризуются при хроматографии на адсорбционных колонках, однако изомеризацию можно пре-

дотвратить, пропитав адсорбент борной кислотой (10% по массе) [104, 116].

Присутствие в остатках жирных кислот дополнительных кислородсодержащих функциональных групп значительно увеличивает их сродство к адсорбенту, что позволяет разделять окисленные жирные кислоты и незамещенные жирные кислоты (т. е. не содержащие каких-либо других функциональных групп, кроме карбоксильной). Так, например, метиловые эфиры стеариновой и пальмитиновой кислот элюируются бензолом, содержащим 5% диэтилового эфира, в то время как для элюирования стеариновой и оксипальмитиновой кислот требуется 40%-ный раствор этилацетата в бензоле, метанол или диэтиловый эфир [117, 118]. В других случаях гидроксильированные и незамещенные жирные кислоты удается разделить градиентным элюированием диэтиловым эфиром в гексане [119, 120]. В работе [121] метилоксипальмитат элюировали смесью диэтилового эфира с гексаном и метанолом (10:5:1).

Колонки с кремниевой кислотой часто применяют для разделения простагландинов в соответствии с содержанием атомов кислорода в их молекулах. Для хроматографии простагландинов как свободных жирных кислот рекомендуется использовать силикагель, промытый кислотой [122]. При работе с флоризидом необходима предварительная промывка сорбента теплой кислотой [123]. Свободные жирные кислоты также разделяют градиентным элюированием, например увеличивая концентрацию этилацетата в гексане [124], циклогексане [125] или бензоле [126, 127] или увеличивая концентрацию метанола в смеси этилацетат — бензол [122] или в хлороформе [129, 130]. Используют также ступенчатое элюирование. При этом в зависимости от источника простагландинов можно получить фракции, содержащие PGA_1 , PGA_2 , PGB_1 и PGB_2 (при элюировании смесью этилацетат — бензол, 3:7), PGE_1 , PGE_2 и PGE_3 (при элюировании смесью этилацетат — бензол, 3:2); гидроксильированные в положении 19 PGA_1 , PGA_2 , PGB_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$ и $\text{PGF}_{2\alpha}$ (при элюировании смесью этилацетат — бензол, 4:1), а также более полярные соединения (при элюировании смесью этилацетат — метанол, 1:1). Сходное разделение можно получить, проводя элюирование PGA , PGE и PGF (и 19-окси-PG) соответственно смесями хлороформ — метанол (49:1), хлороформ — метанол (96:5) и хлороформ — метанол (9:1).

При разделении метиловых эфиров простагландинов используют такие элюирующие системы, как этилацетат — бензол и этилацетат — метанол, в ряде случаев незначительно модифицированные. Хроматографией на колонке с кремниевой кислотой выделены метаболиты простагландина $\text{PGF}_{1\alpha}$ из морской свинки [133], $\text{PGF}_{2\alpha}$ из кролика [134] и PGF_2 из крысы [131].

Бансбах и Лав [123] описали быструю процедуру выделения простагландинов PGA, PGE и PGF на микроколонке с предварительно промытым кислотой флоризилом. Согласно этой процедуре, нейтральные липиды элюируют с колонки смесью бензол—этилацетат (3:2), PGA и PGF—смесью бензол—этилацетат—метанол (30:20:1), PGE—смесью бензол—этилацетат—метанол (15:10:1), а PGF—смесью бензол—этилацетат—метанол (3:2:1). В работе [135] элюирование простагландинов и их аналогов при хроматографии на колонке с кремниевой кислотой проводили смесями диэтиловый эфир—бензол (7:3), этилацетат—метанол (9:1), а тромбоксан B₂ элюировали метанолом.

Хроматографией на колонке с кремниевой кислотой можно отделить триацилглицерины, содержащие остатки эпокси- [136], кето- [137], окси- [138] и ацилоксипроизводных [139] жирных кислот от триацилглицеринов, в составе которых имеются остатки незамещенных жирных кислот, а также очистить сложные эфиры глицерина, образовавшиеся в результате аутоокисления [137, 138]. На колонках с кремниевой кислотой или флоризилом время удерживания простых эфиров глицерина, содержащих остатки окисленных жирных кислот, больше, чем у соответствующих эфиров незамещенных жирных кислот.

Оксид алюминия редко применяют в качестве адсорбента для колоночной хроматографии нейтральных липидов, поскольку на нем может происходить гидролиз сложных эфиров глицерина. Однако авторы работы [13] использовали оксид алюминия для колоночной хроматографии ртутноацетатных аддуктов. Углеводородные соединения легко элюируются с такой колонки гексаном [141].

Главным недостатком адсорбционной колоночной хроматографии липидов является сложность обнаружения веществ в элюате. Обычно хроматографические фракции упаривают досуха и взвешивают или определяют состав элюата методом ТСХ. Непрерывное обнаружение компонентов смеси в поступающем из колонки элюате было бы предпочтительнее, однако его удается осуществить лишь в считанных случаях [142, 143]*.

4.3.2.2. Тонкослойная хроматография

С помощью ТСХ на силикагелях различных типов удается достичь практически такого же разделения нейтральных липидов на отдельные классы, как и на колонках с флоризилом

* Наиболее информативным и универсальным является, по-видимому, гибридный метод, в котором жидкостной хроматограф объединен с масс-спектрометром (см., например, *Argino P. J., Guichon G., Anal. Chem., 51, 682A (1979); Games D. E., Adv. Chromatogr., 21, 1 (1983).* — *Прим. ред.*

или кремниевой кислотой. Препаративную ТСХ часто применяют вместо колоночной хроматографии [14, 17], поскольку ТСХ имеет ряд преимуществ: лучшее разрешение, значительно большую скорость элюирования, более эффективное обнаружение примесных компонентов смеси, а также доступность всех хроматографируемых веществ в процессе хроматографирования и после его завершения. Во многих лабораториях для разделения сложных смесей нейтральных липидов и свободных жирных кислот до сих пор пользуются системой петролейный эфир (фракция с т. кип. 60—70°C) — диэтиловый эфир — уксусная кислота (90:10:1 или 35:15:1), предложенной Мангольдом и Малинсом [144].

Позднее многие исследователи модифицировали систему, заменяя петролейный эфир на *n*-пентан, *n*-гексан или *n*-гептан, а уксусную кислоту — на муравьиную, однако существенно улучшить разрешение им не удавалось. В таких системах, используемых для фракционирования нейтральных липидов, моноацилглицерины и фосфолипиды остаются на старте, в то время как наименее полярные углеводороды мигрируют вблизи фронта растворителя, а более или менее полностью разделяются липиды с промежуточной полярностью. В рассмотренной выше системе наблюдается следующая очередность элюирования нейтральных липидов: углеводороды, сложные эфиры холестерина, метиловые эфиры жирных кислот, триацилглицерины, свободные жирные кислоты, диацилглицерины и свободный холестерин [145]. Шараф и др. [146] успешно разделяли сложные смеси нейтральных липидов методом ТСХ по такой схеме: сначала элюирование проводили гексаном до продвижения фронта растворителя до отметки 19 см от стартовой линии, после чего гексан заменяли на бензол. Когда фронт растворителя перемещался еще на 19 см, пластинку из бензола переносили в систему гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (70:30:1), где после прохождения фронтом растворителя 9 см заканчивали элюирование. На полученной в результате хроматограмме наблюдались разделенные зоны сквалена, сложных эфиров холестерина, восков, диоловых эфиров и метиловых эфиров, ацетонидов простых эфиров глицерина, жирных кислот, холестерина и диацилглицеринов.

Ван дер Вуссе и др. [147] предложили проводить ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода — уксусная кислота (10:10:1:1) до достижения фронтом растворителя отметки 1 см от места нанесения образца, а затем разделять нейтральные липиды в системе гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (240:50:3). 1,3- и 1,2-Диацилглицерины удается эффективно отделить от холестерина в системах диэтиловый эфир — изооктан (4:1) [148], хлороформ — ацетон — метанол

(96:4:1) [66, 149], а также проводя разделение сначала в системе хлороформ—метанол—вода (65:25:4), а затем в системе хлороформ—гексан (3:1) [150]. Манча и др. [151] и Оо и Штумпф [152] разделили моно-, ди- и триацилглицерины и жирные кислоты в системе диэтиловый эфир—бензол—этанол—уксусная кислота (400:500:20:1).

Пропитка силикагеля боратами препятствует изомеризации моно- и диацилглицеринов, а также улучшает разделение их изомеров [153]. Так, изомерные моноацилглицерины можно разделить на силикагелевых пластинках, пропитанных 5—10%-ным боратым буфером, в системе хлороформ—ацетон (24:1). Для очистки 2-моноацилглицеринов была использована более сложная система растворителей: хлороформ—ацетон—метанол—уксусная кислота (170:25:5:1) [154]. Ренконен [155] разделял нейтральные липиды различных классов на пластинках, пропитанных 0,1 М боратым буфером, в системе хлороформ—метанол—3,5 М раствор аммиака (65:35:8), а Лэмб и др. [156] использовали в аналогичных целях систему гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (75:25:2).

Добавляя в систему растворителей для ТСХ триметилборат, можно предотвратить изомеризацию ацилглицеринов [157]. Изомеризации моно- и диацилглицеринов на пластинках с силикагелем проще всего избежать, если проводить хроматографирование не самих ацилглицеринов, а соответствующих производных. Моно- и диацилглицерины можно перевести в ацетаты или *трет*-бутилдиметилсилиловые эфиры. Оба этих типа производных достаточно стабильны в условиях хроматографии, и их можно отделить от других нейтральных липидов в различных системах растворителей для ТСХ этих липидов [16]. Ацетаты моно- и диацилглицеринов по хроматографическим свойствам сходны с триацилглицеринами, содержащими остатки короткоцепочечных жирных кислот. Триацилглицерины и ацетаты диацилглицеринов, в состав которых входят остатки короткоцепочечных жирных кислот, можно отделить от соответствующих три- и диацилглицеринов, содержащих остатки длинноцепочечных жирных кислот, в системе петролейный эфир—диэтиловый эфир (4:1) [158—160]. Улучшить разрешение триацилглицеринов, содержащих короткие и длинные ацильные остатки, можно, применяя две системы элюентов: петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (80:20:1) и диизопропиловый эфир—уксусная кислота (24:1). Вначале проводят двукратное элюирование (по 18 см каждое) первой системой, после чего элюент меняют. Когда фронт второй системы растворителей пройдет 2 см, элюирование заканчивают [161].

Авторы работы [162] очищали карбонаты 1-моноацилглицеринов и 3-моноацилглицеринов методом ТСХ, используя в ка-

честве растворителя 1,2-дихлорэтан. При ТСХ алкил- и алкенилпроизводных ацилглицеринов в большинстве описанных выше систем эти соединения не отделяются от соответствующих ацилглицеринов. В работе [16] рассмотрены пригодные для такого разделения системы растворителей. Триацилглицерины и их алкиловые эфиры можно полностью разделить в системе гексан — диэтиловый эфир (19:1) [163].

Хорошее разрешение ацетатов 1-алкил-2-ацилглицеринов, ацетатов 1-алкен-1-ил-2-ацилглицеринов и 1,2-диацилглицеринов было получено при разделении этих соединений методом двухстадийной ТСХ сначала в системе гексан — диэтиловый эфир (1:1), затем в толуоле [164, 165] (или в системе бензол — гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (45:50:5:1) либо в бензоле [166]).

Алкенилацил-, алкилацил- и диацилглицерины разделяют методом ТСХ не только в виде ацетатов, но и в виде других производных, например *трет*-бутилдиметилсилиловых эфиров [167]. Холестерин можно отделить от диацилглицеринов и алкилацилглицеринов посредством ТСХ в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота (98:2:1) [163]. Такого же результата можно достичь путем разделения предварительно ацетилированных компонентов смеси в системе гептан — изопропиловый эфир — уксусная кислота (15:15:1) [16]. Причем разделение их аналогов с простой эфирной связью можно предотвратить, если проводить ТСХ в системе гексан — диэтиловый эфир — 28%-ный раствор аммиака (40:60:1) [163].

Изомерные моноалкилглицерины легко разделяются методом ТСХ на пластинках с силикагелем, пропитанным 10%-ным боратным буфером в системе хлороформ — ацетон (24:1) [153]. При этом следует учитывать тот факт, что в этой системе простые алкиловые эфиры глицеринов мигрируют быстрее соответствующих моно- и диацилглицеринов [168]. На пластинках силикагеля, пропитанного боратным буфером, можно получить хорошее разделение 1,3- и 1,2-алкилацилглицеринов. На пластинках силикагеля, пропитанного раствором соли мышьяковой кислоты, при элюировании системой этанол — хлороформ (1:9) очередность элюирования 1,3- и 1,2-алкилацилглицеринов меняется на обратную [163]. Разделение 1- и 2-моноалкилглицеринов можно проводить и на пластинках с силикагелем, не содержащем никаких добавок, если использовать 12-компонентную элюирующую систему Кунца [169]. Кислые растворители, вызывающие изомеризацию сложных эфиров глицерина, не оказывают аналогичного влияния на его простые эфиры.

Жирные кислоты с дополнительными функциональными группами, например гидроксильными, и эфиры глицеринов и таких кислот имеют меньшую хроматографическую подвижность

по сравнению с соответствующими жирными кислотами, не содержащими указанных групп, и эфирами глицерина и этих кислот. Поэтому эпокси-, кето-, окси- и диоксипроизводные метилового эфира стеариновой кислоты можно отделить от соответствующего эфира стеариновой кислоты, не содержащего перечисленных групп [170, 171].

Удовлетворительное разрешение жирных кислот и их 2-оксипроизводных было получено при ТСХ в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (80:20:1 или 90:10:1) [172]. Позиционные изомеры моно- и диоксипроизводных жирных кислот можно разделить методом ТСХ в системе диэтиловый эфир — гексан (4:1) [173]. Мацуда и др. [174] провели препаративное разделение 9- и 13-оксистеаратов при помощи ТСХ в системах диэтиловый эфир — петролейный эфир (1:1) или гексан — диэтиловый эфир (3:2). *трео*- и *эритро*-Изомеры вицинальных диоксифиров можно разделить на силикагеле, пропитанном борной кислотой [175]. Другие примеры разделения рассматриваются в разд. 4.4.1.

Жирные кислоты можно также разделить в соответствии с их длиной цепи. Кристиансен и др. [176] очистили эруковую кислоту с помощью ТСХ в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (113:20:1), а Личфилд и др. [177] выделили новую жирную кислоту с длиной цепи 30 углеродных атомов из морской губки посредством ТСХ в системе гексан — диэтиловый эфир (19:1). Микелевые кислоты — кислоты с достаточно большой молекулярной массой, содержащие гидроксильную группу в положении 3 и длинноцепочечный алкильный заместитель в положении 2, легко отделяются от обычных жирных кислот и микелевых кислот с карбонильной, карбоксильной и метильной группами с помощью двустадийной ТСХ. Сначала элюирование проводят в системе петролейный эфир — ацетон (7:3); когда фронт растворителя переместится на расстояние 8 см, эту систему меняют на смесь петролейный эфир — диэтиловый эфир (17:3) и дают фронту растворителя дойти до отметки 15 см [178].

Сложные смеси микелевых кислот разделяют методом двумерной ТСХ, при этом наилучшие результаты дают трехкратное элюирование смесью петролейный эфир — ацетон (19:1) в одном направлении и последующее однократное элюирование смесью тех же компонентов, но взятых в соотношении 99:1, в другом направлении. При разделении описанным методом метанольных экстрактов различных бактерий, содержащих микелевые кислоты, получены разрешенные зоны метиловых эфиров микелевой, метоксимикелевой, кетомикелевой, ω -карбоксимикелевой, негидроксилированных жирных кислот, а также зоны ряда неизвестных липидов [178].

Отделение окисленных жирных кислот от неокисленных представляет особый интерес при выделении простагландинов. Грин и Самуэльсон [179], а также Андерсон [180] разработали для этого различные элюирующие системы. Эти и другие системы, разработанные позднее, рассматриваются в обзоре Даниэльса [122]. Разделение простагландинов, принадлежащих к различным группам, например PGE_1 , PGF_α и PGF_β , чаще всего проводят элюированием смесью бензол — диоксан — уксусная кислота (20:20:1). При этом соединения, содержащие три гидроксильные группы (PGF), имеют меньшую хроматографическую подвижность, чем соединения с двумя гидроксильными группами и одной кетогруппой (PGE_1). Последние в свою очередь имеют большее сродство к неподвижной фазе, чем простагландины с одной окси- и одной кетогруппой (PGA и PGB). Число двойных связей в молекуле не оказывает существенного влияния на очередность элюирования в рассматриваемой системе. При использовании системы хлороформ — метанол — уксусная кислота (от 18:1:1 до 8:1:1) можно с успехом разделить большинство простагландинов и их метиловых эфиров [181, 182]. С помощью ТСХ в указанных системах растворителей можно выделить простагландины из относительно грубых экстрактов липидов. В этих системах простагландины либо мигрируют практически с фронтом растворителя, либо остаются близко к старту. Простагландины группы А и группы В не разделяются на силикагеле, не содержащем добавок, однако на пластинках силикагеля, пропитанного хлоридом железа (III), PGA_1 и PGB_1 легко разделяются в системе диэтиловый эфир — уксусная кислота — гексан (30:1:19) [183]. Для разделения простагландинов с различной длиной цепи авторы работы [184] применили двукратное элюирование смесью хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (450:40:5:4). В последнее время эта система растворителей используется очень часто [29, 186—191].

Разделение простагландинов в виде свободных кислот и их метиловых эфиров было осуществлено [192] в системах этилацетат — бензол — муравьиная кислота (25:25:1) (PGA_2) и этилацетат — бензол — муравьиная кислота (80:20:1) (PGE_2). Даниэльс [122] составил таблицу значений R_f для большого числа метаболитов природных и синтетических простагландинов (ТСХ проводили в рассмотренных выше системах). Лапетина и Куатрекасас [193] сообщили об очень хорошем разделении арахидоновой кислоты, 12-*L*-окси-5,8,10,14-эйкозатетраеновой кислоты, 12-*L*-окси-5,8,10-гептадекатриеновой кислоты, тромбосана B_2 и фосфатидной кислоты при ТСХ в системе этилацетат — уксусная кислота — триметилпентан — вода (9:2:5:10). Все другие фосфолипиды в этом случае

остаются на старте. Вик и др. [194] выделили посредством ТСХ в системе хлороформ — уксусная кислота (50:1) циклическую жирную оксикислоту из экстракта семян льна. Хамберг и др. [195], а также Графф и др. [191] анализировали методом ТСХ продукты реакции циклооксигеназы до и после очистки на колонках с кремниевой кислотой. Разделение проводили на пластинках в системах этилацетат — триметилпентан — петролейный эфир — уксусная кислота (500:500:200:3) и этилацетат — триметилпентан — уксусная кислота (500:500:3) при 4°C. Гамильтон и Тобиас [196] и Графф и др. [191] применили в тех же целях смесь изопропиловый эфир — бутанон-2 — уксусная кислота (50:40:1), а Нугтерен и Хазельхоф [197] и Графф и сотрудники — смесь этилацетат — уксусная кислота (100:1). Мацуда и др. [174] разделили 9- и 13-оксипероксиды, используя в качестве элюента смесь изеооктан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (50:50:1). Метилловые эфиры жирных кислот и диметилацетали с той же длиной цепи можно разделить двухстадийным элюированием — сначала 1,2-дихлорэтаном, а затем смесью диэтиловый эфир — вода (200:1) [198].

Присутствие окисленных жирных кислот в молекулах ацилглицеринов уменьшает хроматографическую подвижность этих соединений по сравнению с ацилглицеринами, содержащими неокисленные жирные кислоты [199]. Миколайчак и Смит [200], а также Смит и др. [201] использовали смесь петролейный эфир — диэтиловый эфир (2:3) для ТСХ сложных триэфиров глицеринов, содержащих до трех гидроксильных групп [202] в каждой молекуле, а также для их ацетоксипроизводных. Яцисиоглу и др. [202] разделили триэфиры глицерина и обычных жирных кислот и эпокси- и оксипроизводных этих кислот методом ТСХ в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (35:15:1).

Метод ТСХ был использован для выделения оксиалкилациглицеринов [203, 204]. Полиацилглицерины, или эстолиды, содержащие более трех сложноэфирных групп, плохо разделяются при помощи ТСХ. Однако авторы работы [205] разделяли триацилглицеринэстолиды путем многократного элюирования. Пейн-Вал и др. [206] повторно определили хроматографическую подвижность синтетических полиацилглицеринов при ТСХ на пластинках с силикагелем при многократном элюировании бензолом. Среди исследованных эстолидов наибольшую подвижность имел тетрацилглицерин, за ним следовали пентацил- и гексацилглицерины. Очередность элюирования при ТСХ на пластинках с силикагелем оказалась сходной с таковой при ВЭЖХ на колонках с сорбентом μ -порасил: с увеличением числа ацильных групп скорость миграции соединения замедлялась, а при увеличении длины цепи повышалась.

Содержание тривернолина в эпоксицированных маслах можно определить с помощью ТСХ, однако эта процедура довольно длительная [207].

Отто и Чунг [208] методом ТСХ разделяли природные моно-, ди- и триацилглицерины и их 2-N-ацилглицерины на пластинках силикагеля длиной 45 см. Сначала элюирование проводили в системе хлороформ — ацетон — уксусная кислота (47:2:1); когда фронт растворителя переместится на расстояние 25 см, эту систему заменяли на смесь диэтиловый эфир — петролейный эфир (1:9) и давали фронту растворителя дойти до отметки 40 см. Во всех опытах природные ацилглицерины мигрировали значительно быстрее соответствующих 2-N-ацилглицеринов.

Фиарс и др. [209] разделяли триацилглицерины природных жирных кислот и их аналогов, содержащих синтетические жирные кислоты (например, 4-бензилоксibenзоат и другие ароматические кислоты), методом ТСХ в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (70:30:1). Авторы [210] применили ТСХ для разделения синтетических псевдотриацилглицеринов (*трис*-гомоацилпроизводных циклопентантиолов-1,2,3).

4.3.3. Выделение фосфолипидов различных классов

Фракцию фосфолипидов, полученную в результате предварительного разделения липидного экстракта, можно далее разделить на фосфолипиды, принадлежащие к различным кислотам, колоночной или тонкослойной хроматографией. Однако для этой цели не все хроматографические системы одинаково пригодны, поэтому следует учитывать эффективность разделения, выход нужного компонента или удобство его извлечения после хроматографии при выборе той или иной системы.

4.3.3.1. Колоночная хроматография

Адсорбционная колоночная хроматография не всегда позволяет достичь полного разделения всех классов фосфолипидов. Однако ее успешно можно применять при выделении фосфолипидов определенного класса из смеси, где эти фосфолипиды преобладают, а также для очистки синтетических фосфолипидов. Нейтральные фосфолипиды эффективно разделяются на колонках с кремниевой кислотой [57]. При этом фосфатидилхолины элюируют смесью хлороформ — метанол (4:1), содержащей 1% воды, а сфингомиелин — смесью тех же компонентов, содержащей 1,5% воды. Для элюирования лизофосфатидилхолина и продуктов его окисления используют метанол с 2% воды. Колонки с кремниевой кислотой также можно применять для

выделения фосфатидилэтаноламина [элюирование проводят смесью хлороформ—метанол (4:1)] и фосфатидилсерина (элюируют метанолом), если адсорбент предварительно обработать аммиаком [211]. Детально этот эксперимент обсужден в обзоре [58]. Используя сходные элюирующие системы, можно получить очищенные фракции кардиолипина, фосфотидилэтаноламина и фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилхолина, сфингомиелина, а также лизофосфатидилхолина [105, 212].

Кроуфорд и Уэллс [213] применили хроматографию на колонках с кремниевой кислотой для разделения фосфатидилхолина и сфингомиелина [элюирование проводят смесью хлороформ—метанол (6:1, 3:1 и 1:1)]. При элюировании смесью хлороформ—метанол (3:1) удается выделить чистый фосфатидилхолин, а смесью тех же растворителей в соотношении 8:1 — фосфатидилэтаноламин. Нейтральные и кислые фосфолипиды были эффективно разделены на колонках с кремниевой кислотой при использовании градиентного элюирования (ступенчатый градиент метанола в хлороформе) [214—216]. При этом кардиолипин и фосфатидилглицерин элюируются 25—50%-ным раствором метанола в хлороформе [216], фосфатидилэтаноламин — 80%-ным раствором метанола в хлороформе, а фосфатидилхолин и сфингомиелин — 100%-ным метанолом [214]. В работе [217] колонки с кремниевой кислотой были использованы для препаративного выделения лизолипидов. В этом случае смесью хлороформ—метанол—вода (25:75:4) элюировали 1-О-алкил- и 1-О-ацилглицерофосфоэтаноламин, а смесью хлороформ—метанол—2 н. раствор аммиака (25:75:4) — лизофосфатидилхолин и сфингомиелины. Чакрабартти и Корана [218] применили колонки с тем же адсорбентом для очистки синтетических фосфолипидов, содержащих светочувствительные группы (например, 4-азидо-2-нитрофенильную группу). Стоффель и Михаэлис [219] и Стуне-Секалик и др. [220] очищали фосфолипиды, ацильные остатки которых содержали соответственно флуоресцентную (остаток антрацена) или спиновую (нитроксильные группы) метку.

Оксид алюминия редко используется в качестве адсорбента для колоночной хроматографии сложных липидов, поскольку он обладает свойствами основания. Неислые липиды можно разделять на колонках с этим носителем, проводя элюирование смесью хлороформ—метанол при соотношении растворителей 1:1 [67] или 2:1 [221]. Монофосфоинозиты элюируют смесью этанол—хлороформ—вода (5:2:2) [222]. При хроматографии кислых липидов необходимо добавлять в элюент соли аммония [223].

Некоторые фосфолипиды можно получить в относительно чистом виде с помощью хроматографии на DEAE- и TEAE-целлюлозах. Элюирование проводят ледяной уксусной кислотой и смесями хлороформ — метанол [57, 58]. Этот метод широко применяется для предварительного выделения различных групп фосфолипидов [20, 76, 224]. Согласно оригинальной методике, фосфатидилэтаноламины элюируют смесью хлороформ — метанол (7:3), а фосфатидилсерин — уксусной кислотой. Руни и др. [76] использовали DEAE-целлюлозу в ацетатной форме для выделения фосфатидилхолина и сфингомиелина. Указанные фосфолипиды элюировали смесью хлороформ — метанол (4:1), а другие кислые фосфолипиды, фосфатидилинозит и фосфоглицерин — смесью хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — 0,05 М ацетат аммония (180:120:9:3,46). Окано с сотр. [224—226] описали аналогичную методику, согласно которой фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин элюируют метанолом, фосфатидилсерин — уксусной кислотой, а фосфатидилинозит и фосфоглицерин — смесью хлороформа с метанолом (2:1), насыщенным раствором аммиака, содержащим 50 мМ ацетата аммония. Кроуфорд и Уэллс [213] применили колонки с DEAE-целлюлозой для разделения холин- и этаноламинсодержащих фосфолипидов: они проводили элюирование фосфатидилхолина и сфингомиелина смесью хлороформ — метанол (12:1), а фосфатидилэтаноламинов — смесью хлороформ — метанол (9:1 и 4:3). Фосфатидилхолин и лизофосфатидилхолин были разделены и очищены на сефадексе LH-20 с использованием градиентного элюирования смесью хлороформ — метанол [227]. Шахт [228] очищал полифосфоинозиты с помощью хроматографии на колонках со стеклянными шариками, содержащими иммобилизованный неомицин.

Последние достижения в области ВЭЖХ фосфолипидов продемонстрировали большие возможности колонок с кремниевой кислотой и эффективность проводимого на них разделения. Однако количества веществ, которые можно разделить с помощью этого метода, сравнительно малы, поэтому вряд ли он найдет практическое применение.

Юнгалвала и др. [229] разделили с помощью ВЭЖХ на колонке с микропаком SI-100 фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, этаноламинные плазмогены в форме дифениламидов, используя для элюирования смесь дихлорметан — метанол — 15 М раствор аммиака (92:8:1 и 80:15:3). Обнаружение проводили при 280 нм. Позднее Юнгалвала и др. [230] смогли добиться хорошего результата при разделении сфингомиелинов и фосфатидилхолинов на колонках с силикагелем, используя для элюирования смесь ацетонитрил — метанол — вода (65:21:14); обнаружение проводили при 210 нм. Кнучи

и др. [231], а также Рейни и Парди [232] разделяли фосфолипиды с помощью аналогичных вариантов ВЭЖХ с использованием пламенно-ионизационного детектора. В работе [232] сообщается об успешном разделении фракции фосфолипидов на липиды, принадлежащие ко всем классам, на колонке с корасилом II длиной 180 см; элюирование проводили смесью хлороформ — метанол — раствор аммиака (500:359:70). Наилучшее соотношение компонентов для разделения фосфатидилхолина и сфингомиелина было выбрано с помощью часто используемого в аналитической химии симплексного метода [233] как статистического приема отыскания оптимума. Более эффективное разделение часто встречающихся фосфолипидов было достигнуто методом ВЭЖХ на колонке с лихросорбом Si-60 с использованием градиентного элюирования смесью *n*-гексан — пропанол-2 — вода (градиент 6:8:0,75 — 6:8:1,4) и обнаружения при 200 нм [234, 235]. Однако при этом не разделяются фосфатидилхолины и длинноцепочечные сфингомиелины. Очередность элюирования липидов из экстрактов мембран тромбоцитов человека была следующей: холестерин, фосфатидная кислота, фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и длинноцепочечные сфингомиелины, лизофосфатидилхолин, короткоцепочечные сфингомиелины.

Блум и др. [236] также использовали колонки с лихросорбом Si-60 для разделения фосфолипидов на 10—12 фракций. В качестве растворителя использовали смесь хлороформ — пропанол — уксусная кислота — вода (20:22:1:2, 40:22:2:7 и 10:22:1:2). Детектирование было облегчено благодаря использованию радиоактивного фосфора. Радиоактивность измеряли непрерывно с помощью проточной ячейки. Были разделены (в порядке уменьшения времени удерживания) следующие вещества: фосфатидная кислота, дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилхолин, сфингомиелин, дифосфатидилинозит. Эти результаты демонстрируют большую эффективность ВЭЖХ при разделении фосфолипидов по сравнению с обычной хроматографией на колонках с кремниевой кислотой. При ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования критическим фактором является скорость потока, которая должна быть достаточно высокой, чтобы не нарушался градиент, но в то же время не слишком высокой, чтобы не ухудшалось разрешение. Использование радиоактивного фосфора в качестве «метки» позволило обнаружить в исходном экстракте фосфолипидов минорные компоненты, которые не были обнаружены в исходном экстракте фосфолипидов с помощью обычных методов детектирования. Неиден-

тифицированные компоненты можно разделить путем полупрепаративной ВЭЖХ, собирая фракции и проводя идентификацию полученных соединений.

Гросс и Собел [237] описали способ быстрого разделения обычных глицерофосфолипидов и лизофосфолипидов с помощью изократического варианта ВЭЖХ с детектированием по поглощению в УФ-области. Элюирование проводили смесью ацетонитрил — метанол — вода (200:50:17). Однако при использовании этой смеси в качестве элюента и катионообменной колонки Ватман PXS 10/25 SCX фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин не разделяются, поскольку в этом случае наблюдается образование очень длинных «хвостов» у пиков. При хроматографии на колонке с порасилом (Waters Associates, Milford, USA) в системе ацетонитрил — метанол — вода (65:21:4) фосфатидилэтаноламин имеет очень короткое время удерживания [238].

4.3.3.2. Тонкослойная хроматография

Для ТСХ основных типов фосфолипидов животных и растительных тканей в качестве растворителей наиболее широко используются смеси хлороформа, метанола и воды с добавлением уксусной кислоты или без нее и раствора аммиака; эти системы впервые были описаны Скипски и Барклаем [94] и Раузером и др. [58]. Хорошей системой такого типа для одномерной ТСХ является смесь хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (25:15:4:2) в сочетании с силикагелем, пропитанным 0,001 М карбонатом натрия [239]. В этой системе полностью разделяются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, фосфатидилхолин, сфингомиелин и лизофосфатидилхолин. Эта система часто используется в ТСХ для качественного и количественного анализа обычных фосфолипидов [240—246]. Нейтральные липиды, ацилглицерины, стерины, эфиры стеринов, воска и углеводороды мигрируют с фронтом растворителя. Минорные кислые фосфолипиды, кардиолипин, фосфатидная кислота, бис-фосфатидная кислота и продукты их дезацилирования недостаточно хорошо разделяются в данной системе, поскольку они также мигрируют с фронтом растворителя; для их разделения лучше использовать смесь хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (50:35:4:2) [247—250]. Эта система позволяет получить разрешенные зоны фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, лизо-бис-фосфатидной кислоты, сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина вместе с фосфатидилинозитом.

В работе [251] была использована смесь хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (17:25:15:6) для очистки синтетического фосфатидилхолина, содержащего пирендека-

ноильную группу в *sn*-2-положении молекулы, а та же смесь с соотношением компонентов 53:25:2:3 была применена для **разделения смеси лизофосфолипидов и свободных жирных кислот** [252].

Кислые системы растворителей, наиболее часто применяемые для одномерной ТСХ, обычно состоят из хлороформа — ацетона — метанола — уксусной кислоты — воды в соотношениях 10:4:2:2:1 [51, 156, 253—255] и 40:15:13:12:8 [256, 257]. В работах [258, 259] эти системы использовали для ТСХ моно-, и ди- и трифосфоинозитов и других соединений. Лин и др. [166] выделили фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, включая плазмалогены, методом препаративной ТСХ в системе хлороформ — ацетон — уксусная кислота — вода (25:15:4:1). Чистоту выделенных соединений в этой работе проверяли ТСХ в системе хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (8:6:2:2:1).

В работе [260] описывается новая кислая система растворителей для одномерной ТСХ, а именно: изооктан — этилацетат — уксусная кислота (16:3:1). Для разделения фосфатидилхолина, фосфатидилинозита, фосфомонометилэтаноламина Нишихара и Кито [261] применили двукратное элюирование: сначала смесью хлороформ — ацетон — метанол — вода — уксусная кислота (50:50:25:5:2), затем смесью хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (18:15:3:1).

Минорные кислые фосфолипиды можно анализировать также методом ТСХ в менее полярных элюирующих системах, содержащих меньшие количества метанола и воды, например хлороформ — метанол — вода (40:10:1) [262, 263]. Система хлороформ — метанол — вода (65:25:4) и сходные с ней [212, 253] подходят для разделения смеси нейтральных липидов с наиболее часто встречающимися фосфолипидами всех классов. В сочетании с пластинками силикагеля, приготовленными с силикатом магния (вместо сульфата кальция) в качестве связующего вещества, эта элюирующая система очень эффективна и широко используется при одномерной ТСХ в количественном анализе [262—264] и в препаративном варианте ТСХ [265, 266]. Она также применяется для ТСХ плазмалогеновых фосфолипидов [267, 268]. Эти фосфолипиды нестабильны в кислых растворителях и могут разлагаться при элюировании и упаривании. Методом ТСХ с использованием этой системы для элюирования можно разделить лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилхолин с фосфатидилинозитом, фосфатидилэтаноламин с фосфатидилсерином, фосфатидилглицерин с кардиолипином и фосфатидной кислотой, нейтральные липиды. Следует отметить, что в такой системе тиоэфирные аналоги фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина мигрируют намного бы-

стрее соответствующих фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina [269]. В работах [54, 270] описано препаративное разделение фосфатидилхолина и других фосфолипидов на пластинках со слоем сорбента толщиной 2 мм в системе хлороформ — метанол — петролейный эфир — вода (8:8:6:1).

Прекрасного разделения фосфолипидов при одномерной ТСХ можно достигнуть, используя в качестве элюента смесь хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:7:1 или 13:5:1) [253]. Эта система широко используется в количественном и качественном анализе обычных фосфолипидов методом ТСХ [271—276]. Содержание метанола в системе существенно влияет на хроматографическую подвижность кислых фосфолипидов [277]. Так, в системе с относительно низким содержанием метанола [хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:7:1)] фосфатидилсерин и фосфатидилинозит мигрируют медленнее фосфатидилхолина [253], в то время как в системе из тех же компонентов, но с более высоким содержанием метанола [хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:17:1)] указанные соединения мигрируют значительно быстрее фосфатидилхолина [253]. Подобные элюирующие системы используются в одномерной ТСХ в основном для отделения холин- и этаноламинсодержащих фосфолипидов от других фосфолипидов, однако в этой системе можно также разделить смеси кислых фосфолипидов, таких, как кардиолипин, цитидиндифосфат диацилглицерина, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин плюс фосфатидная кислота.

В двумерной ТСХ наиболее часто применяются смеси хлороформ — метанол — 14 н. раствор аммиака (13:7:1) или хлороформ — метанол — 7 н. раствор аммиака — вода (26:14:1:1). Используют и другие варианты, например хлороформ — метанол — 14 н. раствор аммиака (75:25:4) [278, 279] и хлороформ — метанол — 7 н. раствор аммиака (65:20:4) [1, 280, 281]. Преимущество основной системы растворителей заключается в том, что она не вызывает разложения алкенилацильных производных фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina (плазмалогенов) при высушивании хроматограмм.

Витиелло и Дзанетта [97] создали систему одномерной высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ), которая позволяет полностью разделить основные галактолипиды, нейтральные липиды и фосфолипиды, встречающиеся в мозге. Разделение проводили на готовых пластинках в системе метилацетат — пропанол-1 — хлороформ — метанол — 0,5%-ный водный раствор хлорида калия (25:25:25:10:9). Были получены разрешенные зоны, соответствующие сфингомиелину, фосфатидилхолину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозиту, фосфатидной кислоте с диацилглицерином, фосфатидилэтаноламину, сульфатидам, церамидам и

нейтральным липидам (вещества указаны в порядке очередности элюирования). Сульфатидам и церамидам соответствуют по две полосы, идентичные с полосами, которые дают незамещенные и гидроксильированные жирные кислоты.

Сходная система ВЭТСХ была использована Шерма и Тачстоуном [282]. Тачстоун и др. [283] определили значения хроматографических подвижностей фосфолипидов в различных системах для ВЭТСХ на готовых пластинках. Прекрасное разделение фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита и лизофосфатидилхолина и сфингомиелина было получено в системе хлороформ—метанол—пропанол-2—0,25%-ный водный раствор хлорида калия—триэтиламин (30:9:25:6:18). Триэтиламин обладает такой же элюирующей способностью, как и этилацетат.

Метод ВЭТСХ позволяет осуществить быстрое разделение с высокой эффективностью и меньшими количествами вещества, чем в обычном варианте. Однако пластинки для ВЭТСХ слишком дороги, чтобы этот метод можно было применять для препаративных целей, и это главный его недостаток.

Различия в скоростях миграции фосфолипидов наилучшим образом используются в двумерном варианте ТСХ с двумя комплементарными системами растворителей, описанном Раузером и др. [253], а также Скипски и Барклаем [94]. Наиболее удачными оказались комбинации основной и кислой или основной и нейтральной элюирующих систем (хотя применяются также комбинации двух кислых или кислой и нейтральной систем). Очень хорошее разрешение получается при использовании основной системы хлороформ—метанол—28%-ный раствор аммиака (13:7:1) в первом направлении и кислой системы хлороформ—ацетон—метанол—уксусная кислота—вода (10:4:2:2:1)—во втором [253]. Эта система очень часто используется как для качественного, так и для количественного анализа фосфолипидов животных тканей методом ТСХ (254, 259, 283—288). Нишихара и Кито [261] модифицировали описанную методику, заменив элюирующую систему для проведения ТСХ во втором направлении на смесь хлороформ—ацетон—метанол—уксусная кислота—вода (40:20:30:3:1) и применили ее для разделения первичного липидного экстракта. Ренконен и др. [1], а также авторы работ [280, 289, 290] использовали смесь хлороформ—метанол—аммиак (65:20:4) для ТСХ в первом направлении вместо соответствующей системы в описанной выше методике. В работах [291—295] сходное разделение было получено в том случае, когда во второй элюирующей системе отсутствовал ацетон.

Несколько лучшее разрешение фосфолипидов путем двумерной ТСХ получается при элюировании основной смесью хло-

роформ — метанол — вода — 28%-ный раствор аммиака (70:30:3:2) в первом направлении и нейтральной смесью хлороформ — метанол — вода (13:7:1) — во втором [296]. Необходимо отметить, что на хроматограммах, полученных в результате двумерной ТСХ в описанных выше системах, зоны фосфатидилглицерина и фосфатидилэтаноламина часто перекрываются, поэтому количественная оценка этих соединений затруднена или невозможна.

Поортиус и др. [297] предложили добавлять 0,4 М борную кислоту к адсорбенту и проводить хроматографию в первом направлении в системе хлороформ — метанол — вода — 28%-ный раствор аммиака (70:30:3:2), а во втором направлении — в системе хлороформ — метанол — вода (13:7:1). Картина расположения определенных фосфолипидов на таких хроматограммах очень сходна с наблюдаемой при выполнении двумерной ТСХ по Раузеру и др. [296], с той лишь разницей, что фосфатидилинозит и фосфатидилсерин расположены в обратном порядке, а фосфатидилглицерин более четко отделен от фосфатидилэтаноламина. Это обусловлено присутствием в силикагеле борной кислоты, которая образует комплексы с соединениями, имеющими вицинальные гидроксильные группы, что в свою очередь вызывает задержку движения соединений [278, 298]. В последнее время разработана усовершенствованная система, позволяющая разделять гидроксилированные и негидроксилированные глицерофосфолипиды [81, 299, 300].

Двумерная ТСХ на пластинках, пропитанных карбонатом натрия, с использованием для элюирования систем хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода (26:14:2:1) и хлороформ — метанол — бутанол — уксусная кислота — вода (18:12:8:4:3) для первого и второго направлений соответственно была предложена Чо и др. [301] в качестве метода разделения смесей фосфолипидов, содержащих лизофосфолипиды. Эта система также нашла общее применение (однако ее недостаток заключается в том, что трудно удалить бутанол).

Система для двумерной ТСХ на пластинках, пропитанных ацетатом магния, описана Хостетлером и др. [302, 303]. При этом в качестве элюента для хроматографии в первом направлении используют смесь хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода (120:60:4:3), а для хроматографии во втором направлении — хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (6:8:2:2:1).

Из-за колебаний атмосферной влажности анализ фосфолипидов с помощью двумерной ТСХ не позволяет получить хорошие результаты компонентов исследуемого образца. Явин и Зутра [304] предложили простой и быстрый метод, который, по их мнению, позволяет избежать этой проблемы. Нововведе-

ние заключается в основном в уменьшении расстояния, проходимо-го растворителем (использование пластинок 10×10 см), и выборе более эффективной элюирующей системы. Они предлагают использовать для хроматографии в первом направлении смесь хлороформ — метанол — 40%-ный метиламин (26 : 12 : 13), а во втором направлении проводить двукратное элюирование: сначала смесью диэтиловый эфир — уксусная кислота (19 : 1), затем смесью хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (10 : 4 : 2 : 3 : 1). Такой метод позволил авторам добиться очень хорошего разрешения зон, соответствующих фосфатидилинозиту, фосфатидилсерину, фосфатидной кислоте, сфингомиелину, лизофосфатидилхолину, фосфатидилхолину, лизофосфатидилэтаноламину, фосфатидилэтаноламину, кардиолипину. Эта методика была также опробована в других лабораториях и получила одобрение [258].

Элюирующая система хлороформ — метанол — 40%-ный метиламин — вода (65 : 31 : 5 : 5) была предложена Гетцем и др. [305] и Айхбергом и др. [306] в качестве элюента для хроматографии во втором направлении. Для хроматографии в первом направлении использовалась смесь хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (52 : 20 : 7 : 3). При этом после хроматографии в первом направлении пластинку элюировали диэтиловым эфиром или ацетоном. Авторы сообщают об очень хорошем разделении с помощью этого метода смеси, состоящей из кардиолипина, фосфатидилглицерина, фосфатидной кислоты, фосфатидилэтаноламина, фосфатидил-N,N-диметилэтаноламина, фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, лизофосфатидилэтаноламина, лизофосфатидилхолина, сфингомиелина. Используются и другие комбинации основных и кислых систем растворителей: хлороформ — метанол — 7 М раствор аммиака (90 : 54 : 11) (первое направление), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (90 : 40 : 12 : 1) (второе направление). Такая элюирующая система применялась при двумерной ТСХ на пластинках силикагеля, пропитанных 2% основного карбоната магния [212]. Другие системы: хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода (50 : 35 : 3 : 3) (первое направление), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (50 : 25 : 8 : 4) (второе направление) [307]; хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (65 : 25 : 2) (первое направление), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (85 : 15 : 10 : 3) (второе направление) [39, 308]; хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13 : 5 : 1) (первое направление), хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (81 : 10 : 45 : 5) (второе направление) [309]. Основная система используется главным образом для ТСХ во втором направлении. Так, применение элюирующей смеси хлороформ — мета-

нол — уксусная кислота (50:25:8) для ТСХ в первом направлении, а смеси хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:7:1) для ТСХ в другом направлении позволяет полностью отделить N-изопропилфосфатидилэтанолмин от других глицерофосфолипидов [310—313]. Нейтральная система хлороформ — метанол — вода (65:25:4) (первое направление) обычно используется в комбинации с системой тетрагидрофур — диметоксиметан — метанол — 2 н. аммиак в соотношении 10:5:5:1 (второе направление) [314, 315].

Двумерная ТСХ с использованием трех элюирующих смесей описана Чапманом и Робертсоном [316] и Чапманом [317]. Согласно этой методике, разделение проводят в три этапа: сначала пластинку элюируют хлороформом, затем в том же направлении — смесью хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (65:30:4) и, наконец, в перпендикулярном направлении — смесью хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (170:25:25:4). С помощью такой процедуры удалось эффективно разделить фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолмин и фосфатидную кислоту.

Проведение двумерной ТСХ в двух кислых системах [хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (25:10:5:5:2) и хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (25:15:4:2)] позволяет получить хорошее разделение сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозита, фосфатидилсерина, фосфатидилэтанолмина и кардиолипина. Васковский и Терехова [319] применили двумерную ВЭТСХ для разделения смесей фосфолипидов, содержащих фосфатидилглицерин. При этом удовлетворительное разрешение всех компонентов было получено при элюировании смесью хлороформ — метанол — бензол — 28%-ный раствор аммиака (65:30:10:6) в первом направлении, а затем смесью хлороформ — метанол — бензол — ацетон — уксусная кислота — вода (70:30:10:5:4:1) — во втором. Использование бензола в первой системе и бензола с ацетоном — во второй улучшает разделение, а также форму пятен по сравнению с обычными системами хлороформ — метанол — аммиак или хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода.

Алкилацил-, алкенилацил- и диацилглицерофосфолипиды не разделяются ни в одной из описанных выше систем ТСХ как в одномерном, так и в двумерном варианте. Однако можно добиться частичного разделения компонентов, если перед хроматографией во втором направлении обработать пластинку кислотой: например, ТСХ в первом направлении проводить в системе хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (65:25:4), затем обработать пластинку парами соляной кислоты, после чего проводить ТСХ во втором направлении в системе хлоро-

форм — метанол — 28%-ный раствор аммиака (50:25:6) [320]. Такая процедура нашла широкое применение при качественном и количественном анализе экстрактов липидов мозга [49, 321]. Позднее Хоррокс и Сан [322] предложили методику, которая сейчас является одной из наиболее используемых при проведении двумерной ТСХ фосфолипидов [323, 324]. Согласно этой методике, в первом направлении проводят хроматографию в системе хлороформ — метанол — 15 н. аммиак (26:13:2) и обрабатывают пластины парами соляной кислоты для расщепления простой эфирной связи в плазмалогенах. Для ТСХ во втором направлении используют смесь хлороформ — метанол — ацетон — уксусная кислота — 0,1 М раствор ацетата аммония (26:10:11:7:2). Этот метод широко применялся в работах [323, 324].

Алкенильные производные можно превратить в соответствующие лизофосфолипиды обработкой пластинок хлоридом ртути (II) после проведения ТСХ в первом направлении [291]. В результате такой обработки удастся отделить лизофосфолипиды, полученные из плазмалогенов, от немодифицированных диацил- и алкилацилглицерофосфолипидов. Индивидуальные плазмалогены и незамещенные фосфолипиды можно разделить после их предварительного дефосфорилирования (разд. 4.3.2.2.). Для разделения фосфатидилхолина и 2-аминоэтилфосфолипидов используют ТСХ в системе хлороформ — уксусная кислота — метанол — вода (375:125:25:11) [325].

Системы для обычной ТСХ, как правило, не позволяют разделить фосфоно- и фосфолипиды; для этой цели применяют системы растворителей с высоким содержанием (85—92%) хлороформа и уксусной кислоты [325, 326]. При этом фосфолипиды мигрируют быстрее, чем соответствующие фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины. Для разделения незамещенных фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина и соответствующих 1-N- и 2-N-ацильных аналогов серина Оэрт и Чунг [208] использовали смесь хлороформ — метанол — вода (65:25:4), однако разделение было частичным. В обеих рассмотренных системах незамещенные фосфатиды мигрировали со скоростью меньшей, чем 1-N-пальмитоилпроизводные, но большей, чем 2-N-линолеилпроизводные.

Масон и др. [327] и Руни и др. [76] использовали трехкратное элюирование смесью хлороформ — метанол — 8 М аммиак (130:70:7) для разделения насыщенных и ненасыщенных аналогов фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина. Хроматографию проводили после обработки ненасыщенных соединений ацетатом ртути (II).

В последнее время большое внимание привлекла тонкослойная хроматография на хроматодах как метод количественного

анализа липидов различных классов [2—4]. Акман и Воевода [328] разделили стандартные смеси фосфолипидов из семян масличных культур на хроматодах после удаления нейтральных липидов с помощью экстракции нейтральных липидов ацетоном и ТСХ в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (60:30:9:3). Посредством ТСХ на хроматодах Тагучи и др. [330] удалось получить очищенные препараты наиболее часто встречающихся фосфолипидов. В качестве элюентов они использовали смеси хлороформ — метанол — вода (80:35:15) или хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (80:15:10:4). Херслоф [329] с помощью такой же процедуры разделил фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин.

4.3.4. Выделение гликолипидов различных классов

Гликолипиды, полученные в результате предварительного фракционирования первичного экстракта липидов, можно далее разделять с помощью адсорбционной или колоночной хроматографии. Наиболее эффективными методами разделения разнообразных соединений этой группы являются ТСХ и ВЭЖХ, однако обычная адсорбционная и распределительная хроматографии в отдельных случаях достаточно эффективны.

4.3.4.1. Колоночная хроматография

Роузер и др. [331] применили колонки с флоризилом для разделения цереброзидов, сульфатов цереброзидов и керамидов. Эти гликолипиды элюировали смесью хлороформ — метанол — диметоксипропан в соотношении 14:6:1 (цереброзиды и их сульфаты) и 19:1:1 (керамиды). Ворбек и Маринетти [332] показали, что колонки с кремниевой кислотой применимы для разделения экстрактов липидов растений. Элюирование смесью хлороформ — ацетон (1:1) позволяет получить фракции моно- и дигалактозилдиацилглицеринов и сульфоллипидов, а элюирование чистым ацетоном — фракцию сульфатидов. Сайто и Хакомори [333] выделили ацетилированные гликолипиды на колонках с тем же носителем, но в качестве элюента была выбрана смесь 1,2-дихлорэтан — ацетон (1:1). Однако следует отметить, что многие исследователи используют описанные системы скорее для концентрирования определенных гликолипидов, чем для получения их в чистом виде [334—336].

Геллерман и др. [59] применили колонки с кремниевой кислотой для выделения моногалактозилдиацилглицеринов из мха; в качестве элюента была взята смесь ацетон — хлороформ — вода (15:30:1). Петерс и сотр. [337, 338] хроматографией на том же носителе проводили очистку глюкоцереброзидов из се-

лезенки [элюент — смесь хлороформ — метанол (19:1)], а Уилсон и соавторы [60] выделяли растительные гликолипиды [элюент — смесь хлороформ — метанол (19:1)]. Хирабаяши [339] удалось осуществить эффективное фракционирование гликолипидов на колонке со смешанным носителем кремниевая кислота — гифло-суперцель (в соотношении 2:1). Элюирование проводили смесью хлороформ — метанол, постепенно увеличивая концентрацию последнего (от 9:1 до 2:3). В результате было получено пять фракций, различающихся по полярности (от менее полярного глюкозилцерамида до более полярного ганглиозида GM_3). При элюировании смесью хлороформ — метанол — вода (65:25:4) колонку с кремниевой кислотой можно также разделить ганглиозиды [340, 341]. Удастся получить три фракции, содержащие ганглиозиды GM_3 , GD_3 и GM_2 соответственно. Остальные ганглиозиды элюируют той же смесью, но с соотношением компонентов 60:35:8.

Нарасимхан и Мюррей [342] использовали методику Ванса и Суили [72] в модификации Йогесварана и др. [343] для разделения на колонке с кремниевой кислотой нейтральных гликофинголипидов и ганглиозидов ткани легких человека.

Магет-Дана и Михальски [344] описали простой метод выделения гематозида NeuNGl-Lac-Cer из эритроцитов лошади; согласно этому методу, аликвоту грубой фракции ганглиозидов после мягкого окисления периодатом восстанавливают боргидридом натрия, содержащим тритий. Полученные соединения используют в качестве маркеров при колоночной хроматографии. Ганглиозиды наносят на колонку с кремниевой кислотой и проводят ступенчатое элюирование растворителями с увеличивающейся полярностью. Основной ганглиозид — NeuNGl-Lac-Cer элюируют смесью хлороформ — метанол — вода (60:35:8). При этом выход данного ганглиозида оказывается достаточно высоким. По-видимому, описанная процедура применима для разделения слабополярных ганглиозидов и нейтральных липидов без использования многократного элюирования.

Андо и др. [345] получили хорошее препаративное разделение нейтральных гликолипидов эритроцитов человека хроматографией на колонках с полностью пористыми сферическими частицами силикагеля (ятробидс, Iatron Lab., Токуо, Япон). Использование линейного градиентного элюирования смесью хлороформ — метанол — вода (от 166:32:1 до 110:84:6) позволило получить по две фракции каждого из ди-, три- и тетрагексозилцерамидов, а также для глобозидов и параглобозидов. Такое фракционирование происходит благодаря различиям в длине цепи жирных кислот и азотсодержащих заместителей в сахаре. Уэно и др. [346] использовали колонки с ятробидсом для дальнейшего разделения фракций ганглиозидов, получен-

ных в результате хроматографии на DEAE-сефадексе. Колонку с ятробидсом перед нанесением промывали сначала смесью хлороформ — метанол — 2,5 М раствор аммиака (3:6:1), а затем смесью хлороформ — метанол — вода (3:6:1) для удаления примесей. Элюирование проводили в два этапа: сначала смесью хлороформ — метанол (17:3) элюировали сульфатиды, затем смесью хлороформ — метанол (1:2) — чистые ганглиозиды.

Судзуки и др. [347] применяли ятробидс для отделения ацетилированных глоботриозилцерамидов от ацетилированных лактотриозилцерамидов. Первые элюировали смесью дихлорэтан — ацетон (4:1), вторые — смесью тех же компонентов, но в соотношении 7:3.

Ионообменная хроматография на DEAE-целлюлозе является эффективным альтернативным методом разделения сложных смесей липидов [20, 58]. Простые липиды, за исключением свободных жирных кислот, можно элюировать хлороформом, холинсодержащие фосфолипиды — смесью хлороформ — метанол (9:1), фосфатидилэтаноламины и ди- и полигексозилцерамиды — смесью тех же компонентов, но в соотношении 1:1.

Наиболее популярными являются методики, описанные Роузером и др. [58] и Николсом и Джеймсом [348]. В настоящее время существует множество модификаций этих методик, причем некоторые из них позволяют значительно изменить разделение [349—351]. Метод ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе нашел применение при анализе гликолипидов тканей [86, 349—354]. Нейтральные и кислые гликофинголипиды разделяют также хроматографией на DEAE-сефадексе [355—358]. Бремер и др. [350] для крупномасштабного выделения ганглиозидов рекомендуют методику, в основе которой лежит хроматография на DEAE-сефадексе А-25. Хроматографию проводят по следующей схеме: после нанесения пробы колонку промывают смесью хлороформ — метанол — вода (15:30:4). После этого ганглиозиды элюируют смесью хлороформ — метанол — 0,8 М раствор ацетата натрия (15:30:4). Для маломасштабного выделения ганглиозидов из плазмы рекомендуется следующая процедура: сначала проводят распределение веществ между двумя фазами смесью хлороформ — метанол (1:1—2:1) и водой, а затем — ВЭЖХ на обращенной фазе с использованием патрона сеп-пак C_{18} (Waters Associates, США); ганглиозиды элюируют метанолом. Иватори и Нагаи [359] и Фридман и др. [351] сравнили различные анионообменники на основе сефадекса по их способности разделять ганглиозиды. Наилучшим оказался DEAE-сферозил; на нем удалось провести хорошее разделение моно-, ди-, три-, тетра- и пентасиалоганглиозидов.

Большинство разделений методом ВЭЖХ проводилось на цереброзидах и полигексозилцереброзидах, предварительно сполна бензоилированных, чтобы облегчить их детектирование с помощью УФ-спектроскопии. Макклюер и Эванс [360] приготовили препараты бензоилированных цереброзидов и разделили также производные, содержащие гидроксильированные и негидроксильированные жирные кислоты, с помощью ВЭЖХ на колонке с сорбентом зипакс (пелликулярный силикагель, фирма Du Pont); в качестве элюента использовали 0,13%-ный раствор метанола в пентане. Эти авторы выделили чистые пербензоилгалактозилцерамиды из грубого хлороформно-метанольного экстракта мозга взрослого животного путем хроматографии на той же колонке с использованием 7%-ного раствора этилацетата в гексане в качестве элюента. Сульфатиды не влияли на разделение. Бензоилированные гликозил- и галактозилцерамиды разделяли на колонке с сорбентом микропак NH₂ (элюент — 1,5%-ный раствор пентанола-2 в циклопентане). Юнгвалла и др. [361] описали условия проведения хроматографического количественного анализа пербензоилированных церамидов, содержащих незамещенные и гидроксильированные жирные кислоты в количестве 0,5—10 нмоль. Церамиды разделяли на колонке с сорбентом зипакс с использованием в качестве элюента диоксана в гексане (градиент концентрации диоксана 2,8—5,5%) или этилацетата в гексане (градиент концентрации этилацетата 2—7%).

Эванс и Макклюер [362] и Уильман и Макклюер [363] применили колонку с сорбентом зипакс для разделения пербензоильных производных моно-, ди-, три- и тетрацерамидов плазмы. Наиболее эффективно разделение при использовании градиентного элюирования (линейный градиент этилацетата 2—17% в гексане). Те же авторы [364] позднее описали методику количественного анализа пербензоилированных производных гликофинголипидов в пикомольных количествах с использованием ВЭЖХ на колонке с сорбентом зипакс. В работе применялось градиентное элюирование (1—20% диоксана в гексане) и обнаружение по поглощению при 230 нм. Были разделены полигексозидцерамиды, содержащие до четырех углеводных остатков. Судзуки и др. [347] получили хорошее разделение О-ацетил-N-п-нитробензоилпроизводных нейтральных гликофинголипидов методом ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования [градиент концентрации изопропанола 1—5% в смеси гексан — дихлорэтан (2:1)]. Ватанабе и Арао [365] не проводили химической модификации образца перед нанесением на колонку. Они также использовали градиентное элюирование (элюирующая система пропанол-2 — гексан — вода).

Бремер и др. [350] описали метод количественного анализа

моносиалоганглиозидов в виде пербензойных производных с помощью ВЭЖХ. Хроматографию проводили на колонках с сорбентом дихросфер SI 4000, которые элюировали растворами диоксана в гексане [использовался линейный градиент концентрации диоксана 7—23%, время создания градиента 18 мин]. Обнаружение по поглощению при 230 нм дало возможность анализировать до 50 пмолей образца. Был проведен полный анализ 1 мл плазмы крови и получены разрешенные пики, соответствующие GM_1 , GM_2 , GM_3 и GM_4 (указаны в порядке выхода с колонки). Проведение ВЭЖХ полисиалоганглиозидов показало, что пербензойные производные GD_3 мигрируют медленнее, чем соответствующие производные GM_1 , и поэтому не мешают определению количества GM_1 . Сходным образом GD_{1a} и GD_{1b} мигрировали медленнее, чем GD_3 , и не мешали анализу моносиалоганглиозидов. Бензоилированным GD_{1a} и GD_{1b} соответствовал не один пик, а множественные или асимметричные широкие пики.

4.3.4.2. Тонкослойная хроматография

Для ТСХ гликолипидов в качестве растворителей используются главным образом ацетон, пиридин и тетрагидрофуран [314, 366]. Эти растворители служат донорами электронов и образуют водородные связи с многочисленными гидроксильными группами гликолипидов. Так, можно эффективно отделить моно- и дигалактозилдиацилглицерины от других липидов с помощью ТСХ в системе ацетон — бензол — вода (91:30:8) [367, 368]. Эта система использовалась для препаративного выделения этих гликолипидов, причем наилучшее разрешение было получено при использовании силикагеля, пропитанного сульфатом аммония [369]. Другой хорошей системой для разделения растительных гликолипидов является смесь хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота (146:50:3:1) [370]. В этой системе можно разделить 6-О-ацилпроизводные моногалактозилдиацилглицеринов и глюкозиды стерина, которые отделяются от 2-моноацилглицеринов и незамещенных жирных кислот. Моногалактозилдиацилглицерины хорошо отделяются от N-ацилфосфатидилэтаноламина и других полярных липидов, которые остаются на старте. Увеличение содержания ацетона в системе хлороформ — ацетон — вода (15:30:1) приводит к увеличению подвижности полярных липидов, поэтому, используя эту систему, можно разделить моногалактозилцерамид, моногалактозилмоноацилглицерины, дигалактозилдиацилглицерины и дигалактозилмоноацилглицерины. Прекрасное разделение гликолипидов растений было получено при использовании других систем, используемых для ТСХ фосфолипидов, а именно: хлоро-

форм — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода с соотношением компонентов 24:14:2:1 [370], 160:20:7:4 и 800:100:15:7 [371]. Для выделения моногалактозилдиацилглицерина использовалась система хлороформ — метанол — аммиак — 2-пропиламин (130:70:10:1) [371—373]. Сходные картины разделения гликолипидов можно получить с помощью ТСХ некоторых более простых элюирующих систем [72, 374, 375]. Глюкозил- и галактозилцерамиды мигрируют вместе, однако эти вещества могут быть разделены на силикагеле, пропитанном борной кислотой [298, 376].

Многократное элюирование удачно выбранными системами растворителей позволяет заметно улучшить разделение гликолипидов. Согласно одной из таких методик, успешно применяемой при разделении гликолипидов животных тканей, вначале проводят ТСХ на пластинке силикагеля в системе ацетон — пиридин — хлороформ — вода (40:60:5:4), дают пластинке высохнуть, после чего в том же направлении элюируют последовательно смесями диэтиловый эфир — пиридин — этанол — 2 М раствор аммиака (65:30:8:2) и диэтиловый эфир — уксусная кислота (100:3) [347]. Во время ТСХ в первой системе мигрируют только нейтральные липиды и гликолипиды, а фосфолипиды остаются на старте. В процессе второго элюирования с пластинки вымываются нейтральные липиды, в то время как гликолипиды остаются связанными с неподвижной фазой. При использовании последней элюирующей смеси удаляются свободные жирные кислоты, мигрирующие с подвижной фазой. В этой системе нейтральные липиды имеют большую хроматографическую подвижность, чем моногексозилцерамиды, а все фосфолипиды двигаются медленнее тетрагексозилцерамидов. При использовании описанной методики удается достичь очень хорошего разделения церамидов, моногексозилцерамидов, сульфатидов, дигексозилцерамидов, психозина, тригексозилцерамидов, N-ацетилгексозаминцерамидотригексозидов, кардиолипина. В данном случае гликолипиды разделяются в основном вследствие различий в содержании моногексозидных звеньев, а сфинголипиды — благодаря различиям в длине углеводородной цепи и числе гидроксильных групп в сфингозиновом основании [377]. Цереброзиды и сульфатиды можно разделить путем двукратного элюирования смесью хлороформ — метанол — вода (720:125:14) [378].

Глицерогликолипиды растительного [379] и микробного [380] происхождения хорошо разделяются в системах хлороформ — метанол — вода и хлороформ — вода — ацетон [370]. Даже смеси более сложных бактериальных гликолипидов, таких, как глицерофосфорилдиглюкозилдиацилглицерины стрептококков, легко разделяются с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (65:35:8) [381]. Тадано и Ишизука

[382] использовали элюирующие смеси хлороформ — метанол — вода (65:25:4), хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода (60:35:1:7), хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (10:4:2:2:1) для разделения галактозилцерамидов, лактозилцерамидов, GbOSe₃-церамидов, GbOSe₄-церамидов и GM₃. Санг и Суили [383] разделили смесь гликозилсфинголипидов GL₂, GL₃, GL₄ и тригексозилцерамидов в системе хлороформ — метанол — вода (50:21:3). Для выделения фосфогликолипида из *Acholeplasma* в работе [64] использована система хлороформ — метанол (9:1). Гликолипиды из бычьих сперматозоидов разделяли в системе хлороформ — метанол — вода (40:10:1) [71]. Более сложные нейтральные церамидоолигосахариды, содержащие от 5 до 8 моносахаридных остатков, удобно разделять после перевода их в полностью ацетилированную форму [384].

Сфинголипиды и ганглиозиды, содержащие сиаловую кислоту, обычно разделяют ТСХ в системах пропанол — вода и хлороформ — вода — метанол с добавлением аммиака или без него [385—387]. Система пропанол — вода (7:3) [385] оказалась достаточно эффективной в случае ТСХ шести ганглиозидов, состоящих из тетрагексозилцерамидов, связанных с одной или несколькими молекулами сиаловой кислоты. В работах [388, 389] фракцию ганглиозидов из ткани молочной железы коровы разделяли методом ТСХ в системе пропанол-1 — 28%-ный раствор аммиака — вода (14:61:1). При этом были получены разрешенные зоны GM₃, GM₂ и GM₁ (указаны в порядке уменьшения их хроматографической подвижности). Для препаративной ТСХ используют смесь хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака — вода (60:35:7:3) [389]. Эта система применялась также для препаративного выделения ганглиозидов из клеточной линии карциномы молочной железы крыс [390]. Смит [391] и Свеннерхольм и др. [376] разделяли гликолипиды в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:4). Описание других систем растворителей для ТСХ углеводсодержащих липидов читатель может найти в работах [11, 99].

Зейфрид и др. [392] и Андо и др. [393] показали, что ганглиозиды можно эффективно разделять с помощью ТСХ и ВЭТСХ в системе хлороформ — метанол — 0,02%-ный водный раствор хлорида кальция (60:35:8) или в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. раствор аммиака (60:35:8). Ивасори и Нагаи [359] фракционировали ганглиозиды мозга человека и животных. В качестве элюента для ТСХ в данных работах использовали смеси хлороформ — метанол — 2,5 н. раствор аммиака (60:40:9), хлороформ — метанол — вода (65:35:8), хлороформ — метанол — 0,25%-ный раствор хлорида калия (60:35:8). Комбинирование хроматографии на колонке с DEAE-сефа-

дексом с последующей ТСХ позволило авторам этой работы выделить по крайней мере 25 неидентифицированных ганглиозидов (наряду с уже известными соединениями).

Иейтс и др. [394] применили элюирующую систему хлороформ — метанол — 0,02%-ный водный раствор хлорида кальция (5:4:1) для ТСХ ганглиозидов из нейральных опухолей человека и клеток двух глиом, выращенных в культуре. Очень хорошее разделение ганглиозидов, принадлежащих к подклассам GQ, GT_{1b}, GD_{1b}, GD_{1a}, GD₃, GM₁, GM₂ и GM₃, было получено при использовании готовых пластинок силикагеля. Образцы очищенных ганглиозидов были получены с помощью ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода — 28%-ный раствор аммиака (60:35:7:1) на пластинках с толщиной слоя силикагеля 0,5 мм.

Шварцман [395] разделял ганглиозиды также на готовых пластинках силикагеля в системе хлороформ — метанол — вода (60:35:8), содержащей 20 мг хлорида кальция на 100 мл растворителя. Для ТСХ нейтральных гликофинголипидов он использовал в качестве элюента смесь хлороформ — метанол — вода (65:25:4). Положение разделившихся компонентов на пластинках определяли с помощью автордиографии (третий вводили в остаток церамида в молекулах ганглиозида, нейтральных гликофинголипидов и сфингомиелинов с помощью [³H]-боргидрида в присутствии Pd в качестве катализатора).

Используя двумерную ТСХ, можно улучшить разделение гликолипидов и более полно освободиться от возможных примесей. Хорошее разделение цереброзидов, содержащих незамещенные жирные кислоты, цереброзидов, содержащих гидроксильрованные жирные кислоты, гексозилцерамидов, сульфатидов с незамещенными жирными кислотами, сульфатидов с гидроксильрованными жирными кислотами, ганглиозидов, моногалактозилдиацилглицеринов, дигалактозилдиацилглицеринов и сульфолипидов можно получить при использовании следующих систем растворителей: хлороформ — метанол — вода (65:25:4) (первое направление) и *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (3:1:1) (второе направление); хлороформ — метанол — 28%-ный раствор аммиака (13:7:1) (первое направление), хлороформ — ацетон — метанол — уксусная кислота — вода (10:4:2:2:1) (второе направление) [58].

Грей [314] и Карли и Льюис [86] применили двумерную ТСХ для разделения гликофинголипидов щитовидной железы. В качестве элюента были использованы смеси хлороформ — метанол — вода (65:24:4) (первое направление), тетрагидрофуран — метилаль — метанол — 4 М раствор аммиака (10:5:4:1) (второе направление). Были получены разрешенные зоны моно-, ди- и тригексозилцерамидов, аминокгликолипида и сульфатида.

Охаши [396] разделил ганглиозиды ТСХ с использованием двукратного элюирования: в первом направлении смесью хлороформ—метанол—28%-ный раствор аммиака—вода (60:40:3:6), а во втором—смесью пропанол-1—28%-ный раствор аммиака—вода (15:1:5) или хлороформ—метанол—вода (60:40:9). Эти методы оказались очень полезными для предварительной идентификации малых количеств ганглиозидов (4—5 мкг сиаловой кислоты на пятно).

44. Разделение смесей липидов на индивидуальные соединения

При обсуждении имеющихся в настоящее время данных любое разделение внутри определенного класса липидов мы будем рассматривать как разделение индивидуальных соединений, хотя отдельные компоненты не всегда могут быть получены в какой-либо одной хроматографической системе или даже при сочетании нескольких систем. Для разделения жирных кислот, а также их эфиров и амидов в пределах всего класса липидов наиболее эффективными из доступных сейчас методов являются следующие: ТСХ на носителях, содержащих ион серебра, ГЖХ на жидких полярных фазах, ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой. В большинстве случаев эффективность разделения значительно увеличивается, если разделяемые соединения предварительно превратить в их менее полярные и термически более устойчивые производные.

4.4.1. Жирные кислоты

Жирные кислоты обычно разделяют ГЖХ на жидких полярных фазах после их превращения в метиловые эфиры. Однако для идентификации неизвестных жирных кислот удобнее первоначально разделить их на группы, одинаковые по степени ненасыщенности и геометрической конфигурации. Такое разделение осуществляют различными хроматографическими методами, но в основном ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра.

4.4.1.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра, используется для разделения жирных кислот в комбинации с колоночной хроматографией [397], ВЭЖХ [398] и особенно с ТСХ [399]. Метод основан на том, что между ионами серебра и двой-

ными связями в углеводородной цепи образуется комплекс с обратимым переносом заряда [400, 401]. Бэррет с сотр. [399] и Дадли и Андерсон [402] показали, что ТСХ на носителях, содержащих нитрат серебра, является эффективным методом для фракционирования смесей эфиров жирных кислот в соответствии с числом двойных связей в молекуле. Однако воспроизводимые результаты получаются только при относительной влажности, равной 42—44%. Выход эфиров с высокой степенью ненасыщенности (5—6 двойных связей) составляет примерно 80%; потери происходят в основном из-за окисления. Хроматографией на носителях, содержащих ионы серебра, можно разделять также *цис*- и *транс*-изомеры и позиционные изомеры [399, 402, 403].

Минникин и др. [404] использовали ТСХ на носителях с ионами серебра для дальнейшего фракционирования миколовых кислот, которые были гомогенны по данным адсорбционной ТСХ, а Рао и др. [405] выделяли в препаративных количествах жирные кислоты с длинной боковой цепью, используя в качестве элюента смесь гексан — диэтиловый эфир (4:1). Илинов [406] предложил для разделения метиловых эфиров жирных кислот использовать в качестве сорбента силикагель, пропитанный сульфаматом серебра. Это позволяет получать при проявлении более интенсивно окрашенные зоны, чем при использовании только силикагеля. Элюирование в этом случае осуществляется смесью *n*-гексан — петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (35:12:2:1) при температуре 12—15°C. Сульфаминовая кислота не влияет на разделение липидов.

Для разделения полиненасыщенных жирных кислот используют адсорбционную [397] или распределительную [398] колоночную хроматографию на носителях с ионами серебра, так как выход жирных кислот в этом случае увеличивается вследствие уменьшения окисления пероксидами. Для разделения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот ДеВрие [397] предложил использовать хроматографию на колонках с кремниевой кислотой, пропитанной нитратом серебра. Недостаток таких колонок — их недолговечность [407, 408]. Тем не менее во многих случаях они находят практическое применение. Невилл и др. [409] использовали колонки с носителем AgNO_3 — унисил для отделения метилового эфира *цис*-вакценовой кислоты от следовых примесей других метиловых эфиров. Элюирование проводили 15%-ным раствором бензола в петролейном эфире, затем 50%-ным раствором бензола в петролейном эфире и, наконец, диэтиловым эфиром, причем большая часть *цис*-вакценовой кислоты элюировалась 50%-ным раствором бензола в петролейном эфире. Поскольку нитрат серебра ограниченно растворяется в растворителях, применяемых для ВЭЖХ, колонки, содержащие носители с нитратом серебра, пригодны для работы по меньшей

мере в течение двух месяцев при ежедневном использовании [398]. Озцимдер и Хаммерс [398] показали, что ВЭЖХ на колонках, содержащих носители с ионами серебра, представляет собой быстрый препаративный метод предварительного разделения высоконенасыщенных жирных кислот с 3—6 двойными связями. Разделение проводили на носителе партисил 10, содержащем 5% (по массе) нитрата серебра; в качестве элюента использовали 4%-ный раствор ацетонитрила в *n*-гексане. Ацетонитрил конкурирует с ионами серебра за участки связывания, с которыми он образует комплекс (1:1), и, таким образом, оказывает сильное влияние на элюирование ненасыщенных жирных кислот [410].

Ранее Лэм и Грушка [411] показали, что *n*-бромфенацетил-эфирные эфиры жирных кислот прекрасно разделяются с помощью ВЭЖХ на носителях, пропитанных нитратом серебра, причем возможно разделение даже *цис*- и *транс*-изомеров. *транс*-Изомеры элюируются раньше, чем соответствующие *цис*-изомеры.

Адлоф и др. [412] изучали возможность применения распределительной хроматографии на смолах, содержащих ионы серебра, для разделения изомеров эфиров октадекадиеновой кислоты. Было установлено, что время, которое необходимо для элюирования метилового эфира *цис,цис*-октадекадиеновой кислоты с колонки, содержащей в качестве носителя сульфониевую кислоту, насыщенную ионами серебра, гораздо меньше времени при использовании смолы со степенью насыщения серебром 60—90% от теоретической. Смеси метиловых эфиров *цис,транс*-, *транс,транс*-, *транс,цис*- и *цис,цис*-октадека-12,15-диеновых кислот были разделены в двадцать приемов на колонке со степенью насыщения серебром, равной 91%. Адлоф и Эмкен [413] использовали принцип распределительной хроматографии на смолах, содержащих ионы серебра, для разделения смеси сложных эфиров насыщенных, моно-, ди-, три- и тетраеновых жирных кислот на колонке с XN-1010 (Rohm & Haas). Однако использовать этот принцип для разделения смесей жирных кислот и смесей триацилглицеринов оказалось невозможным. Сообщалось о разделении изомеров сложных эфиров моно- и диеновых жирных кислот на насыщенной серебром крупнопористой катионообменной смоле [414]. Разделение изомеров эфиров моноеновых жирных кислот можно легко провести при наличии 10—20 г образца, а для выделения эфиров *цис,цис*-диеновых и *цис,цис,цис*-триеновых жирных кислот требуется длительное время элюирования и большое количество метанола; форма получающихся при этом пиков далека от идеальной. Добавление к элюенту гексана-1 значительно ускоряет элюирование благодаря конкуренции гексана-1 с серебром за участки связывания [415].

Шофилд [416] для разделения метиловых эфиров жирных

кислот и их изомеров объединил метод хроматографии на крупнопористых ионнообменных смолах, содержащих ионы серебра, с ВЭЖХ. Элюирование метилового эфира линолевой кислоты с колонки и, следовательно, быстрое разделение диенов улучшались при нагревании колонки от 25 до 70 °C; в качестве элюента применяли метанол. Для разделения метиловых эфиров жирных кислот, содержащихся в масле из семян подсолнечника, Мордрет и др. [417] использовали хромароды, пропитанные нитратом серебра. В обзоре Шофилда [418] описаны возможности разделения геометрических изомеров метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот с помощью противоточного распределения, ТСХ на носителях с ионами серебра и колоночной хроматографии на смолах, содержащих ионы серебра.

Гласс и др. [419] обнаружили, что фурансодержащие жирные кислоты обладают большой величиной R_f в случае разделения их на носителях с ионами серебра методом ТСХ. Их метиловые эфиры мигрируют вместе с метиловыми эфирами насыщенных и моноеновых жирных кислот; элюирование проводят смесью гексан — диэтиловый эфир (3:1). Необходимо отметить, что окси-*цис*-ениновые кислоты легко превращаются в кислоты, содержащие фурановое кольцо при обработке щелочью или в ходе хроматографии на носителях, содержащих ионы серебра [420].

4.4.1.2. Газо-жидкостная хроматография

ГЖХ — наиболее эффективный метод разделения сложных смесей природных жирных кислот; при этом существуют корреляции между временем удерживания и структурой жирной кислоты [421, 422]. Однако присутствие в смесях природных жирных кислот большого числа изомеров не позволяет провести полную идентификацию разделенных соединений, за исключением простейших смесей. Предварительная хроматография на носителях, содержащих ионы серебра [423], или препаративная ГЖХ [424] значительно облегчают идентификацию большинства разделенных жирных кислот. Такое предварительное разделение должно быть включено в регулярно используемую методику разделения и схему идентификации. Жирные кислоты с длинными и короткими цепями, а также незамещенные и окисленные жирные кислоты эффективно разделяются адсорбционной хроматографией и хроматографией на носителях, содержащих ионы серебра. Идентификация будет более полной, если использовать ГХ в сочетании с масс-спектрометрией [425].

В обзорах, посвященных ГЖХ, можно найти описание методик, часто применяемых для систематического разделения этих соединений, и схемы идентификации природных и синтетических

жирных кислот [15, 17, 426], а также рекомендации по приготовлению метиловых эфиров жирных кислот. В работе Эмкена [427] кратко описаны основные методы, используемые при анализе меченных радиоактивными изотопами жирных кислот, в частности метод радио-ГЖХ.

Жирные кислоты с короткими цепями можно разделять методом ГЖХ, используя различные жидкие фазы, обогащенные нелетучими органическими или неорганическими кислотами [5, 7] (для блокирования мест сорбции на носителе и материале подложки). Акман [422] показал, что для достижения адекватного разделения и элюирования свободных жирных кислот с колонок ГЖХ необходимо добавлять муравьиную кислоту в газ-носитель. Этерификация жирных кислот с короткими цепями значительно улучшает их хроматографические характеристики, не влияя при этом на очередность элюирования. Последняя зависит от молекулярной массы соединения (более низкомолекулярные элюируются первыми). Для разделения и идентификации простых эфиров жирных кислот с короткими цепями в сложных смесях можно использовать как обычные насадочные [428], так и капиллярные [429] колонки. Ашес и Хакен [430] детально изучили взаимосвязь структуры и времени удерживания алкильных и изоалкильных эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с короткими цепями при ГЖХ на различных полярных и неполярных фазах.

Жирные кислоты, полученные с помощью ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, можно разделить при помощи ГЖХ на короткоцепочечные, с цепями средней длины, длинноцепочечные и циклические. Смеси жирных кислот с длинными цепями обычно плохо разделяются, за исключением простейших смесей [7, 431]. Детальное обсуждение методики разделения нормальных, разветвленных монометил-, разветвленных полиметил- и циклических жирных кислот с короткими цепями и цепями средней длины на полярных и неполярных колонках можно найти в работах Кукуиса [15], Ли Кен Ие [17] и Ашеса и др. [432]. Разделение эфиров разветвленных монометил- и незамещенных жирных кислот с одним и тем же числом атомов углерода зависит от положения места ответвления, а также от присутствия изо-, антеизо- и неоиномеров [422]. Хроматографическое поведение эфиров жирных кислот с двумя и более метильными заместителями в углеводородной цепи описывается с помощью концепции аддитивности функциональных значений длины цепи [432].

Эфиры циклических жирных кислот это в основном эфиры циклопропановых кислот. Все природные формы являются *цис*-изомерами; они имеют немного большее время удерживания, чем *транс*-формы, получаемые синтетически [433]. Другие жирные кислоты с циклической структурой являются алициклическими

жирными кислотами [434]. Ошима и Арига [435] использовали ГЖХ для идентификации 11-циклогексилундекановой и 13-циклогексилтридекановой кислот из ацидофильных термофильных бактерий, а Гласс с сотр. [419, 436] — для идентификации фурансодержащих жирных кислот из смесей липидов рыб.

Ненасыщенные жирные кислоты обычно вначале разделяют по числу двойных связей в молекуле с помощью ТСХ на носителях, содержащих нитрат серебра, а затем изучают методом ГЖХ фракции моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексаеновых жирных кислот по отдельности. Однако из-за неполного разделения методом ТСХ (вследствие различий в длине цепи и наличия позиционных изомеров) каждая фракция содержит жирные кислоты нескольких типов (с числом двойных связей, отличающихся на единицу). *цис*- и *транс*-Изомеры можно разделить ТСХ на носителях с нитратом серебра [437, 438]; такое разделение можно также осуществить с помощью ГЖХ, используя определенные неподвижные фазы. Так, метиловые эфиры олеиновой и элаидиновой кислот (так же как и метиловые эфиры других насыщенных и ненасыщенных C_{18} -жирных кислот) можно разделить на достаточно длинных колонках (6 м) с 15% OV-275 [439].

Моно-, ди- и полиеновые жирные кислоты, как правило, разделяют на обычных колонках для ГЖХ, содержащих полярные жидкие фазы (10% EGSS-X, 10% DEGS, 10% EGS) или некоторые неполярные жидкие фазы (10% апиезона L). Подобные разделения обычно проводят при постоянной температуре $\sim 200^\circ\text{C}$, хотя в некоторых случаях используют более высокие температуры (220°C) [15, 17].

Цианоалкилсилоксан (силар-10С) является примером жидкой фазы с более высокой термической устойчивостью, при использовании которой *цис*- и *транс*-изомеры разделяются значительно лучше, чем при применении полиэфирных жидких фаз [440, 441]. Природные *цис*- и *транс*-моноеновые и полиеновые жирные кислоты эффективно разделяются методом ГЖХ на стеклянных капиллярных колонках [444, 445].

Эфиры полиеновых жирных кислот имеют время удерживания большее, чем время удерживания соответствующих моно- и диеновых аналогов с тем же числом углеродных атомов. Метиловые эфиры природных *цис*-, *цис*-октадекадиеновых кислот с двойными связями, разделенными двумя метиленовыми звеньями, при хроматографии на полярных и неполярных колонках проявляют уникальные различия в значениях эффективной длины цепи (ЭДЦ) в зависимости от положения двойной связи при ГЖХ с использованием полярных и неполярных жидких фаз [446]. Помимо незамещенных 1,4-диеновых жирных кислот с несопряженными двойными связями существуют природные и

синтетические 1,3-диеновые жирные кислоты с сопряженными двойными связями. Наличие сопряженных двойных связей значительно увеличивает время удерживания по сравнению с временем удерживания изомеров с несопряженными двойными связями при ГЖХ как на полярных, так и на неполярных колонках. Значения ЭДЦ для ряда метиловых эфиров *цис*, *цис*- и *транс*, *транс*-октадекадиеновых кислот приведены в работах [446, 447]. Полностью *цис*-изомеры имеют наименьшие, а полностью *транс*-изомеры — наибольшие времена удерживания при ГЖХ как на полярных, так и на неполярных колонках. Исключение составляют изомеры с сопряженными двойными связями (при использовании в качестве жидкой фазы DEGS), а также изомеры с двойными связями, разделенными одним метиленовым звеном.

При использовании в качестве жидкой фазы апиезона L *цис*, *цис*-соединения элюируются раньше соответствующих *транс*, *транс*-изомеров, а при ГЖХ на ХЕ-60 наблюдается обратный порядок.

Метиловые эфиры простых длинноцепочечных ацетиленовых жирных кислот, выделяемые методом ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, оказываются загрязненными олефиновыми жирными кислотами со сравнимой степенью ненасыщенности. ГЖХ на обычных насадочных колонках при использовании полярных и неполярных жидких фаз является эффективным методом предварительной идентификации ацетиленовых жирных кислот (при наличии соответствующих стандартных соединений). Эфиры длинноцепочечных жирных кислот ацетиленового ряда характеризуются большим временем удерживания, чем эфиры соответствующих олефиновых кислот, однако на практике использовать это различие во временах удерживания, как правило, не удается из-за наличия позиционных изомеров, вносящих неясность в картину хроматографического разделения. В работе [448] сообщается о значениях ЭДЦ для ацетиленовых и *цис*-олефиновых ундекановых кислот при ГЖХ на таких жидких фазах, как апиезон L, DEGS и силар-10С. Лие Кен Ие [449] изучил хроматографические характеристики метиловых эфиров изомерных ундециновых и *цис*-ундеценовых кислот при ГЖХ на полярных и неполярных жидких фазах. Установлено, что FFAP, карбовакс 20 М и ХЕ-60 более эффективны, чем DEGS, а OV-101 и Е-30 сравнимы с апиезоном L. Значения ЭДЦ для ряда метиловых эфиров октадекадиновых жирных кислот с тройными связями, разделенными двумя метиленовыми звеньями, можно найти в работе [450], в которой, в частности, указывается, что силар-10С — наилучшая жидкая фаза для разделения изомеров таких кислот. Эта жидкая фаза оказалась наиболее эффективной при ГЖХ метиловых эфиров октадекадиновых кислот с тройными связями, разделенными тремя метиленовыми звеньями.

ми, и метиловых эфиров соответствующих *цис*, *цис*-октадекадиеновых кислот, а также позиционных изомеров эфиров ацетиленовых и олефиновых кислот [451]. Авторы ряда других работ [452, 453] отмечают, что вклад одной тройной связи в значение относительного времени удерживания соизмерим с вкладом трех двойных связей. Поведению при ГЖХ жирных кислот с различным положением двойных и тройных связей посвящен обзор [17].

Эфиры микелевых кислот, не разделяющиеся с помощью адсорбционной ТСХ, были выделены из смеси и фракционированы посредством ГЖХ на колонках с неполярной жидкой фазой [454, 455]. Такаги и др. [456] разделили эфиры холестерина и жирных кислот по молекулярной массе и степени ненасыщенности на колонках с жидкой фазой силар-10С, применив метод, в котором используется градиент температуры (240—270 °С). Были также установлены значения ЭДЦ для эфиров холестерина и жирных кислот с длиной цепи 14—22 углеродных атома, не содержащей или содержащей до 6 двойных связей. Кёниг и Бенке [457] сообщили о разделении с помощью ГЖХ энантиомерных О-трифторацетильных и О-триметилсилильных производных 2-оксикарбоновых кислот и разветвленных карбоновых кислот в виде диастереомерных эфиров (+)-3-метил-2-бутанола на капиллярных колонках с SE-30. В работе были разделены энантиомерные 2-оксипальмитаты, 2-оксимеристаты и 2-оксилатуры, а также множество оксикарбоновых кислот с более короткими цепями, ГЖХ трифторацетильных и триметилсилильных производных этих соединений позволила получить более высокий выход компонентов с улучшенной формой пика на хроматограмме.

4.4.1.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В последние годы опубликовано большое число методик разделения жирных кислот с помощью ВЭЖХ. Поскольку обнаружение по поглощению в УФ-области спектра не позволяет уловить малые количества жирных кислот, были разработаны методы получения производных с сильным поглощением в УФ-области; это позволило значительно повысить уровень работ в этой области [458—461]. Среди таких производных наиболее часто используют фенациловые [441, 460], нитробензиловые [460] и 2-нафтациловые [462] эфиры. Однако применяют также рефрактометрический [8, 9] и пламенно-ионизационный [398] детекторы. Разделение проводят обычно на колонках с обращенной фазой [458—462], однако используются и адсорбционные колонки [463].

Очень хорошее разделение метиловых эфиров жирных кислот из печени трески было получено на колонках с сорбентом лихросорб 10 RP-18 при элюировании ацетонитрилом [398]. Это разделение основано на различии в коэффициентах распределения жирных кислот, поэтому наблюдалось перекрывание зон эфиров, имеющих соответствующие коэффициенты распределения. Пики собирали и анализировали с помощью ГЖХ. На этой колонке можно также разделять *цис*- и *транс*-изомеры жирных кислот. В работах [461, 464, 465] такие изомеры были разделены методом ВЭЖХ с использованием 90—80%-ного водного раствора метанола для элюирования. При этом *цис*-изомеры элюировались первыми, что объясняется наличием стерических препятствий при взаимодействии молекул элюента с двойными связями карбоновых кислот. Хотя *n*-бромфенацетил- и 18:3(ω 3)- и 18:3(ω 6)-кислот разделяются посредством ВЭЖХ [464], такая хроматографическая система малоприспособна для разделения позиционных изомеров. В работе [462] нафтацетил-эфирные жирные кислоты с короткими цепями разделяли на колонке с обращенной фазой C_{18} лихросорб путем градиентного элюирования водным ацетонитрилом (выпуклый градиент от 38 до 75% ацетонитрила).

Уортен [465] для разделения метиловых эфиров олеиновой и элаидиновой кислот использовал колонки с носителем μ -бондапак C_{18} порасил, элюирование смесью метанол — вода и рефрактометрическое детектирование. На колонке с C_{18} порасилом Шофилд [466] разделил эфиры жирных кислот по длине цепи и степени ненасыщенности, используя в качестве элюента водный ацетонитрил, а на колонках с бондапаком C_{18} порасил (диаметр частиц 37—75 мкм) с водным ацетонитрилом — аликваты, содержащие 200 мг эфиров жирных кислот. Шофилду [467] удалось разделить *цис*- и *транс*-изомеры в течение 1 ч. Лэм и Грушка [411] разделяли *цис*- и *транс*-изомеры жирных кислот в форме фенацетил-эфиров, что позволило проводить детектирование по поглощению в УФ-области.

Байли и др. [468] анализировали свободные жирные кислоты, экстрагируемые из маргарина, на колонке с обращенной фазой Fatty Acid Column (Waters Associates) с диаметром частиц 10 мкм. Жирные кислоты элюировали смесью тетрагидрофуран — ацетонитрил — вода (5:7:9), содержащей 0,1%-ный раствор уксусной кислоты (эта добавка улучшает форму пиков), специально разработанной для разделения этих соединений. Авторы использовали рефрактометрическое детектирование. Время анализа составляло 50 мин. Было определено соотношение *цис*- и *транс*-изомеров октадеценовых кислот, восемь жирных кислот были определены количественно. Однако на данной колонке не разделялись пальминовая и линоэлаидиновая 18:2,

$\Delta 9$ (*транс*), 12 (*транс*)-кислоты. Колонки с обращенной фазой лихросорб хибар-II RP-8 (диаметр частиц 10 мкм) в сочетании с элюирующей смесью тетрагидрофуран — ацетонитрил — вода (3:67:30), содержащей 0,1% уксусной кислоты, являются лучшей системой для разделения близких по свойствам карбоновых кислот. В последнее время применяют предколонки с порасилом А для насыщения подвижной фазы соединениями кремния, что позволяет продлить время жизни колонки. Установлено, что использование чистого тетрагидрофурана в качестве компонента подвижной фазы ухудшает разделение пиков. В заключение следует отметить, что с помощью хроматографии на колонке RP-8 не удается разделить 18:2, $\Delta 9$ (*цис*), 12 (*транс*)- и 18:2, $\Delta 9$ (*транс*), 12 (*цис*)-жирные кислоты.

4.4.2. Окисленные жирные кислоты и простагландины

Простагландины и окисленные жирные кислоты сходной полярности, полученные адсорбционной хроматографией, можно далее фракционировать до получения индивидуальных соединений методами ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, ГЖХ и ВЭЖХ. Для этой цели жирные кислоты, как правило, модифицируют, но в некоторых случаях хроматография окисленных жирных кислот в свободной форме позволяет получить очень хорошие результаты.

4.4.2.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

Ненасыщенные эпоксикислоты можно разделить на насыщенные, моно- и диеновые ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра в системе бензол — хлороформ — диэтиловый эфир (25:25:1). Для хроматографии используют эфиры этих кислот [469]. Эфиры оксикарбоновых кислот различной степени ненасыщенности разделяются в смеси бензол — хлороформ — диэтиловый эфир (10:10:3) [469] или бензол — диэтиловый эфир (1:1) [470]. На силикагеле, пропитанном нитратом серебра и борной кислотой, можно разделить эфиры оксикислот по степени ненасыщенности и в соответствии с *трео*- или *эритро*-конфигурацией вицинальной гликольной группы [471].

Методом ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, можно разделять фракции простагландинов на индивидуальные компоненты по числу двойных связей, доступных для комплексообразования с ионами серебра. Рамвелл и Даниэльс [472] и Даниэльс [122] составили таблицу относительных скоростей миграции для большого числа различных простагландинов при ТСХ на указанных носителях в различных элюирующих системах.

Указывается, в частности, что можно получить полное разделение PGE_1 , PGE_2 , PGE_3 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{1\beta}$, $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{PGF}_{2\beta}$, $\text{PGF}_{3\alpha} + \text{PGF}_{3\beta}$, $\text{PGA}_1 + \text{PGA}_2 + \text{PGB}_1$, PGB_2 при использовании в качестве подвижной фазы смеси этилацетат—2,2,4-триметилпентан—уксусная кислота—этанол—вода (22:2:6:7:20); PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha} + \text{PGF}_{1\beta}$, $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{PGF}_{2\beta}$, $\text{PGA}_1 + \text{PGB}_1$, PGA_2 , PGB_2 , MePGE_1 , MePGE_2 , $\text{MePGE}_{1\alpha}$, $\text{MePGE}_{2\beta}$, $\text{MePGA}_1 + \text{MePGA}_2$ при использовании в качестве подвижной фазы смеси этилацетат—2,2,4-триметилпентан—уксусная кислота—вода (9:5:2:10); PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha} + \text{PGF}_{1\beta}$, $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{PGF}_{2\beta}$, $\text{PGA}_1 + \text{PGB}_1$, $\text{PGA}_2 + \text{PGB}_2$, MePGE_1 , MePGE_2 , $\text{MePGE}_{1\alpha}$, $\text{MePGE}_{2\alpha}$, $\text{MePGA}_1 + \text{MePGA}_2$ в системе хлороформ—метанол—уксусная кислота (18:1:1); PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha} + \text{PGF}_{1\beta}$, $\text{PGF}_{2\alpha} + \text{PGF}_{2\beta}$, $\text{PGA}_1 + \text{PGB}_1$, $\text{PGA}_2 + \text{PGB}_2$, MePGE_1 , MePGE_3 , $\text{MePGE}_{1\alpha}$, $\text{MePGE}_{1\alpha}$, $\text{MePGE}_{2\alpha}$, $\text{MePGA}_1 + \text{MePGA}_2$ в системе хлороформ—метанол—уксусная кислота (8:1:1) и MePGE_1 , MePGE_2 , MePGE_3 , $\text{MePGE}_{1\alpha}$, $\text{MePGE}_{2\alpha}$, $\text{MePGE}_{3\alpha}$ в системе этилацетат—метанол—вода (4:1:1).

ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, применяется также для разделения некоторых метаболитов простагландинов [122]. Так, при использовании в качестве подвижной фазы смеси этилацетат—2,2,4-триметилпентан—уксусная кислота—вода (10:3:1:10) разделяют PGE_1 в смеси 11 α ,15-диокси-9-оксопрост-5-еновой кислотой, PGE_2 , 11 α ,15-диоксопростановой и 11 α -окси-9,15-диоксопрост-5-еновой кислотами. Более того, при использовании в качестве подвижной фазы смеси этилацетат—2,2,4-триметилпентан—уксусная кислота—вода (11:3:2:10) можно разделить 5 α ,7 α ,11,15-тетраокситетранорпростановую кислоту с 5 α ,7 α ,11,16-тетраокситетранорпростановой кислотой и 5 α ,7 α ,11,15-тетраоксинорпрост-9-еновую кислоту с 5 α ,7 α ,11,16-тетраокситетранорпрост-9-еновой кислотой. Для этих целей силикагель пропитывают нитратом серебра, либо добавляя последний в суспензию для заливки пластинок, либо погружая готовые пластинки в раствор 5—20%-ного нитрата серебра.

Однако главной проблемой остается элюирование простагландинов с силикагеля, особенно в субнанограммовых количествах. Выход менее 50% в данном случае считается неплохим результатом. Поскольку метиловые эфиры обычно элюируются с более высокими выходами, чем свободные жирные кислоты, при количественном анализе предпочтительнее использовать эфиры. ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, позволяет полностью разделить ННТ и 12-НЕТЕ, однако при этом PGE_2 мигрируют вместе с TXB_2 .

Метиловые эфиры простагландинов разделяют также с помощью ионообменной хроматографии на смоле амберлит-15 (Rohm & Haas) в присутствии солей серебра. В этом случае

PGE₁ элюируют 95%-ным этанолом, а PGE₂ — 5%-ным циклогексаном в 95%-ном этаноле [129]. Сходная процедура была использована для разделения PGA₂ и 5-транс-PGA₂ [473]. Меритт и Бронсон [474] применили колонки с мелкодисперсными катионообменниками, обработанными ионами серебра, для ВЭЖХ *m*-нитрофенилацетатов некоторых простагландинов.

4.4.2.2. Газо-жидкостная хроматография

Туллок [475] и Туллок и Мазурек [476] разработали схему идентификации большинства изомерных оксистеаратов с помощью ГЖХ на трех жидких фазах: EGS, QF-1 и SE-30. В качестве стандартов использовались 12-окси-, ацетокси- и оксистеараты, полученные из гидролизованного касторового масла. О'Брайен и Роузер [477] разделили все изомерные метилокси-пальмитаты путем ГЖХ на жидких фазах EGS, DEGS и апиезон L, а ацетоксипальмитаты — на EGS. Карлссон и Пашер [478] описали методику хроматографического разделения и анализа 2-оксикислот и их производных (в различных конфигурациях) с использованием в качестве неподвижной фазы 3%-ного OV-1. Значения ЭДЦ для некоторых кетокислот и родственных соединений, полученных в результате химических превращений некоторых природных жирных кислот, приведены в работе [479].

Вуд и др. [480] сообщили о разделении полиоксиметилловых эфиров триметилсилильных (ТМС) производных жирных кислот с помощью капиллярной ГЖХ (неподвижная фаза апиезон L). Были частично разделены метиловые эфиры *трео*- и *эритро*-изомеров 9,10-диоксистеариновых кислот, а также метиловые эфиры диастереомерных 9,10,12-триоксистеариновой и 9,10,12,13-тетраоксистеариновой кислот. Вуд [481] также показал, что можно использовать насадочные колонки для разделения изопропилиденовых производных диоксиолеиновой и диоксиэлаидиновой кислот. На колонке с EGSS-X изопропилиденовые производные восьми диастереомеров, полученных в результате гидроксилирования линолевой кислоты, разделяются частично с появлением 5 пиков на хроматограмме. Изопропилидентрифторацетильные производные четырех диастереомерных триоксикарбоновых кислот, полученных в результате окисления перманганатом в щелочной среде рицинолевой и рициноэлаидиновой кислот, разделяются ГЖХ полностью, и получают четыре пика.

Несколько групп исследователей детально изучили хроматографическое поведение простагландинов при ГЖХ; результаты этих работ обсуждаются в обзорах [122, 482, 483]. При использовании пламенно-ионизационного детектора соединения типа PGF обычно разделяют в виде метиловых эфиров ТМС-производных или ацетоксипроизводных. Однако для PGE к настоя-

щему времени не найдено подходящих производных. Во избежание дегидратации и образования двойного пика в результате оксимирования простагландины PGE-ряда переводят в соединения типа PGA и PGF, которые затем соответствующим образом модифицируют и подвергают хроматографии [484]. Чувствительность обнаружения повышается при применении электронно-захватного детектора. Так, Ювенац и сотр. [485, 486] смогли проанализировать простагландины PGE₁ и PGE₂ в виде бромсильных производных PGB₁ и PGB₂ соответственно в субнанogramмовых количествах, используя электронно-захватный детектор. С помощью электронно-захватного детектора можно анализировать пикограммовые количества ТМС-производных пентафторбензиловых эфиров PGF_{2α} [487, 488] и оксимов пентафторбензиловых эфиров простагландинов D и E [489, 490].

Скринска и Буткус [491] описали методы приготовления и использования пентафторбензиловых эфиров PGE₁, PGE₂, PGF_{1α} и PGF_{2α}. В результате модификации компонентов смеси PGE₁ и PGE₂ превращаются в ТМС-эфиры PGB₁ и PGB₂, а PGF_{1α} и PGF_{2α} образуют просто ТМС-эфиры PGF_{1α} и PGF_{2α}. Сходное модифицирование позволяет проводить анализ простагландинов групп А и В в виде соответствующих производных. Разделение проводят на обычных колонках, содержащих 3% QF-1. В качестве газа-носителя применяют смесь аргон — метан (19:1), детектирование проводят с помощью детектора по захвату электронов (с использованием изотопа ⁶³Ni). В случае трифторацетильных [122, 486] и гептафторбутирильных [492, 493] производных получают противоречивые результаты, по-видимому, вследствие нестабильности этих соединений. Большинство опытов по разделению простагландинов методов ГЖХ проводится на колонках с 1% SE-30 при температуре 190—230 °C, однако иногда используют менее полярные полиэфирные фазы (DMCS). Даниэльс [122] собрал обширный материал по подбору хроматографических условий для анализа первичных простагландинов в форме ацетатов, метоксимов ацетатов, ТМС-эфиров и метоксимов ТМС-эфиров.

Нугтерен [494] сообщил о применении боргидрада натрия и цинка в соляной кислоте для полного восстановления простагландинов в углеводороды. Преимущество такого расщепления состоит в том, что продукты дегидратации соединений типа PGE или лактонов различных простагландинов в конечном итоге все превращаются в один и тот же тип химических соединений.

Пейс-Ассиак и Вульф [495] использовали *n*-бутилборат для специфической модификации вицинальных оксигрупп простагландинов E и F с целью их последующего разделения с помощью ГЖХ. Применение персильных производных PGF_{2α} позволяет повысить чувствительность обнаружения [496], а

трет-бутилдиметилсилильные производные удобны при использовании масс-спектрометрии [497].

Применение капиллярных колонок, по-видимому, повысит интерес к ГЖХ как методу исследования простагландинов. Приведем некоторые примеры успешного использования этого метода. Ригауд и др. [498] получили очень хорошие результаты при разделении 11-эпи-PGF_{2α}, 13,14-дигидро-PGF_{2α}, 11-эпи-PGF_{1α} и 15-эпи-PGF_{1α} за 6 мин на 20-метровой колонке с полисилоксаном при температуре 235 °С. Маклоуф и др. [499], используя капиллярные колонки с полисилоксаном, разделили сложные эфиры простагландинов, в том числе смеси, содержащие ТМС-эфиры PGF_{2β}, PGF_{1β}, 13,14-дигидро-PGF_{1β}, 15-эпи-PGF_{2α}, 15-эпи-PGF_{1α}, PGF_{3α}, 5-*транс*-PGF_{2α}, 15-кето-PGF_{2α} и PGF_{1α}. Фитцпатрик [500] описал методику разделения простагландинов и тромбоксанов с помощью капиллярной ГЖХ.

Простагландины типа Е плохо разделяются методом ГЖХ, поэтому их анализируют в виде оксимов или превращают в соответствующие простагландины типа В. Никозия и Галли [484] разработали методы одновременных метилирования и силлирования PGE₁ и PGE₂, а также методику превращения их в соответствующие PGB₁ и PGB₂ с использованием смеси ТМС-имидазола и пиперидина.

Наиболее эффективной комбинацией методов идентификации и количественного определения индивидуальных простагландинов является сочетание ГЖХ и масс-спектрометрии с детектированием по выбранному иону и с использованием соответствующих стабильных изотопномеченных внутренних стандартов [501—503].

4.4.2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Жидко-жидкостная хроматография также является эффективным методом разделения смесей окисленных жирных кислот и простагландинов на индивидуальные соединения. Однако большинство этих соединений не обладает существенным поглощением в области 220 нм, поэтому их необходимо предварительно превращать в производные, поглощающие в УФ-области.

В работе [504] метиловые эфиры гидроксированных жирных кислот, полученные при свободнорадикальным окислением полиненасыщенных фосфатидилхолинов, разделили с помощью ВЭЖХ на колонке с порасилом (диаметр 10 мкм, Waters Associates). В качестве подвижной фазы использовали 0,5%-ный раствор этанола в гексане; метиловые эфиры гидроксированных жирных кислот детектировали по поглощению в области 235 нм. При анализе свободных гидроксированных жирных кислот в качестве подвижной фазы использовали смесь уксус-

ная кислота — пропанол-2—гексан (1 : 16 : 983). Продукты окисления арахидоновой кислоты кислородом воздуха очищали посредством ВЭЖХ по сходной методике [505, 506]. Фитцпатрик [507] разделял простагландины $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 и PGD_2 в форме *m*-нитрофенациловых эфиров, используя детектирование по поглощению в УФ-области. Меритт и Бронсон [474, 508] проводили ВЭЖХ *m*-нитрофенациловых эфиров на колонке с ионообменной смолой, обработанной солями серебра.

Остерлинг и др. [509] выбрали *m*-нитробензиловые эфиры PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ и PGA_2 в качестве производных, поглощающих в УФ-области, и использовали их для хроматографии на колонке с зипаксом. Указанные соединения элюировали 31%-ным раствором пропанола или 30%-ным водным раствором метанола. Следует отметить, что такие растворители нельзя использовать для элюирования PGI_2 , поскольку в этом случае при хроматографии на колонках с силикагелем или обращенной фазой [510] он спонтанно превращается в 6-оксо- $\text{PGF}_{1\alpha}$.

Турк и др. [511] использовали флуоресцентные 4-бромметил-7-метоксикумариновые производные простагландинов и тромбоксана для ВЭЖХ. В единственном проведенном эксперименте было достигнуто полное разделение PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 6-кето- $\text{PGF}_{1\alpha}$ и тромбоксана B_2 ; использовалось градиентное элюирование двумя смесями растворителей: хлороформ — изооктан — метанол (35 : 65 : 1) и хлороформ — метанол (80 : 1). Если исследователь не имеет достаточного количества материала или невозможно получение производных, обнаружение по поглощению в области менее 220 нм позволяет получить удовлетворительные результаты.

Уортон и др. [512] описали методику очистки PGE_1 от PGE_2 , 13,14-дигидро- PGE_2 и других родственных простагландинов с помощью ВЭЖХ. Они использовали колонку для хроматографии жирных кислот (Fatty Acid Column, Waters Associates) и элюирующую систему вода — ацетонитрил — бензол — уксусная кислота (767 : 230 : 2 : 1) в качестве подвижной фазы. Методика Уортона и др. [513] основана на использовании сцинтилляционного счетчика спектрофотометрии, что создает дополнительные трудности в работе, к тому же время удерживания в описанном авторами случае чрезмерно велико (1 ч). Хилл [514] сообщил о том, что ему удалось отделить простагландин (PGFI_2) от продуктов гидролиза этого соединения — 6-оксопростагландин $\text{PGF}_{1\alpha}$, а также от примесей других простагландинов на приготовленной в лаборатории колонке с обращенной фазой. Элюирование проводили смесью вода — метанол (1 : 2), содержащей 2,5 г/л борной кислоты и 3,8 г/л буры.

Виналда и др. [515] изучили вклад различных компонентов описанной системы и пришли к выводу, что присутствие метано-

ла в элюенте приводит к образованию метилкеталей. Наличие этих соединений проявилось в виде отдельных пиков на хроматограмме и осложнило анализ. Авторы предлагают использовать вместо метанола 20%-ный водный раствор ацетонитрила в буфере, содержащем 0,009 М борную кислоту и 0,004 М буру (рН 9,3). Рекомендуются также колонка с μ -бондапаком C_{18} .

Инаяма и др. [516] разделили 6-кето-PGF $_{1\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$, PGF $_2$, PGE $_1$, PGA $_2$ +PGB $_2$, PGA $_1$ +PGB $_1$ с помощью ВЭЖХ [система вода — ацетонитрил — тетрагидрофуран (35:15:1), обнаружение по поглощению в УФ-области]. Время анализа составило 10 мин. Эта методика пригодна также для анализа тромбксана B $_2$ (эквивалентен тромбоксану A $_2$) и лейкотриенов в мягких условиях при нейтральном рН (вместо щелочной среды) [514, 515].

Ван Роллинз и др. [517] описали процесс ВЭЖХ, с помощью которого удастся полностью разделить все основные продукты, образующиеся при действии циклооксигеназы и липоксигеназы на арахидоновую кислоту. Были полностью разделены немодифицированные 6-кето-PGF $_{1\alpha}$, тромбоксан B $_2$, PGF $_2$, PGE $_2$, PGD $_2$, HHF и 12-НЕТЕ. Авторы использовали колонку с ультрасфером ODS (диаметр частиц 5 мкм, Altex Scientific, США), детектирование по поглощению в области 192 нм и градиентное элюирование (градиент концентрации ацетонитрила 30,5—95% в водной фосфорной кислоте, рН 2,0). Сообщается также о частичном разделении немодифицированных простагландинов с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [518, 519].

Хансену и Букхейву [520] удалось получить очень хорошее разделение простагландинов PGE и PGF $_{\alpha}$ в форме свободных жирных кислот на сефадексе LH-20 в системе 1,2-дихлорэтан — гептан — метанол (25:25:2). Были полностью разделены простагландины PGA, 15-кетодигидро-PGE, PGE $_1$, 15-кето-PGE $_1$, 15-кетодигидро-PGF $_{1\alpha}$, 15-кето-PGF $_{1\alpha}$ и PGF $_{1\alpha}$. В такой системе не разделяются дигидро-PGE $_1$ и PGE $_2$, однако их можно разделить в системе 1,2-дихлорэтан — метанол (50:1).

Большие надежды возлагаются на комбинацию ВЭЖХ и масс-спектрометрии, которая, возможно, найдет в будущем широкое применение для идентификации и количественного анализа индивидуальных простагландинов, как в свое время это произошло с ГХ и масс-спектрометрией [521].

4.4.3. Нейтральные ацилглицерины

По степени ненасыщенности нейтральные ацилглицерины можно разделять с помощью ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, и фракционировать с помощью ГЖХ по молекулярной массе, а при обращенно-фазовой ВЭЖХ происходит раз-

деление по обоим указанным параметрам. Не полностью замещенные ацилглицерины обычно предварительно превращают в соответствующие производные, которые затем подвергают хроматографии.

4.4.3.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра (в большинстве случаев ТСХ), — один из основных методов разделения ацилглицеринов на индивидуальные соединения. Например, триацилглицерины, выделенные с помощью обычной адсорбционной хроматографии, можно далее фракционировать по содержанию двойных связей в молекуле с помощью ТСХ на носителях с ионами серебра [53, 522].

Путем хроматографии смеси природных триацилглицеринов на силикагеле, содержащем 10—20% нитрата серебра, в системах диэтиловый эфир, бензол — диаэтиловый эфир (9:1) [522], гексан — диэтиловый эфир (7:3) или хлороформ — метанол (47:3) [53] удается получить до двадцати фракций. Олигоеновые триацилглицерины также можно успешно разделить на таком носителе при использовании 1—2%-ного раствора метанола в хлороформе [53, 523]. В этом случае полиненасыщенные триацилглицерины остаются практически на старте, однако их можно разделить путем дополнительного элюирования 5%-ным раствором метанола в хлороформе. Описанный метод позволяет разделять триацилглицерины, содержащие насыщенные (0), моноеновые (1), диеновые (2) и триеновые (3) жирные кислоты на соединения следующих типов: 000, 001, 011, 002, 111, 012, 112, 022, 003, 122, 013, 222, 113, 023, 123, 223, 033, 233, 033, 133, 233, 333 [522].

Такаги и Итабаши [524] описали методику, в которой используется двукратное элюирование смесями хлороформ — метанол (97:3) или бензол — хлороформ (9:1), а также трехкратное элюирование смесью хлороформ — метанол (19:1). С помощью такого элюирования авторам удалось получить хорошее разделение триацилглицеринов на носителях, содержащих ионы серебра. Однако многократное элюирование сходными с описанными выше или отличными смесями растворителей не имеет широкого применения [525, 526].

Триацилглицерины, содержащие жирные кислоты, отличные от рассмотренных выше (окси- [522], эпокси- [527] и кетокислоты [528]), также можно успешно разделить на индивидуальные соединения на носителях с ионами серебра. Однако для этого требуются более полярные элюирующие системы, чем применяемые в случае обычных триацилглицеринов [529]. В работе

[527] триацилглицерины, содержащие эпоксидированные жирные кислоты, разделяли в системе бензол — диэтиловый эфир (3:1), а триацилглицерины, содержащие оксикислоты, Ганстоун и Куренин разделяли в диэтиловом эфире [528]. Аналоги триацилглицеринов с одной или более простыми эфирными связями вместо сложноэфирных можно также разделить на таких носителях, причем в тех же системах, в которых разделяют триацилглицерины [163, 531]. Интересно отметить, что циклопропеновые жирные кислоты реагируют с нитратом серебра с образованием нескольких продуктов [530].

Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра, используется также для разделения *sn*-1,2(2,3)- или *sn*-1,3-диацилглицеринов. Удобной системой для разделения свободных *sn*-1,2-диацилглицеринов является смесь хлороформ — этанол (93:7). При ТСХ в этой системе указанные диацилглицерины можно разделить на соединения следующих типов: 00, 01, 11, 02, 12, 03 и 04, где 0—4 показывают число двойных связей в молекуле [532, 533]. Поскольку фракционирование зависит от общего числа двойных связей и их распределения в остатке жирной кислоты, находящейся в положении 1 или 2 молекулы глицерина, в результате ТСХ можно получить более одной фракции, которые будут содержать соединения с одинаковой степенью ненасыщенности. Диацилглицерины, содержащие *цис*- и *транс*-моноосновые кислоты, можно разделить, используя большинство элюирующих систем [534]. Перед проведением ТСХ рекомендуется модифицировать свободные диацилглицерины, так как они могут изомеризоваться при хроматографии на носителях, содержащих ионы серебра. Используются ацетильные [535, 536], *трет*-бутилдиметилсилильные [537] и иногда нестабильные ТМС-производные [471, 538].

Хроматографией на носителях данного типа можно разделить ацетаты диацилглицеринов на индивидуальные соединения, как насыщенные, так и содержащие до 12 двойных связей. Многие позиционные изомеры также разделяются с помощью этого метода [539]. Удаётся достичь разрешения, сходного с описанным выше для свободных ди- и триацилглицеринов. Ацетаты насыщенных диацилглицеринов и диацилглицерины, содержащие до четырех двойных связей, хорошо разделяются в системе хлороформ — метанол (99:1) [540, 541]. Однако смеси более ненасыщенных диацилглицеринов можно разделить лишь в более полярных элюирующих смесях, таких, как смесь хлороформ — метанол (19:1) [539]. С помощью ТСХ в подобных системах можно фракционировать 1,3-диацилглицерины и их производные. Ацетаты *sn*-1,2-диацилглицеринов, полученные из фосфатидилхолина легочной ткани были разделены на носителе, содержащем ионы серебра, путем двухстадийного элюирования

смесью хлороформ — метанол (19:1) и хлороформом [542, 543]. Ацетаты алкен-1-илацил- и алкилацилглицеринов можно разделять на индивидуальные соединения по степени ненасыщенности на носителе, содержащем ионы серебра, в системе бензол — хлороформ (9:1) [164, 544] или хлороформ — метанол (49:1) [545]. Ацетаты насыщенных алкен-1-илглицеринов мигрируют медленнее, чем ацетаты насыщенных алкилацилглицеринов, вследствие «тормозящего» эффекта двойной связи в алкен-1-ильном остатке. Ацетаты диацилглицеринов имеют хроматографическую подвижность, среднюю между подвижностями глицеридов с простой эфирной связью и глицеридов, содержащих остатки жирных кислот той же степени ненасыщенности [537].

Моноалкил- и моноацилглицерины, насыщенные и имеющие до двух двойных связей, можно разделить путем ТСХ в системе хлороформ — метанол (9:1) [166, 546, 547], а насыщенные и мононенасыщенные 2-метоксиалкилглицерины — в системе 2,2,4-триметилпентанэтилацетат — метанол (50:40:7). Для анализа моноацилглицеринов лучше использовать сами моноацилглицерины, чем соответствующие жирные кислоты, так как менее вероятно загрязнение образцов посторонними моноацилглицеринами, чем свободными жирными кислотами.

Недавно было показано, что хромароды, пропитанные нитратом серебра, можно использовать для разделения и количественного анализа синтетических трипальмитоил-, триолеил- и трилинолеилглицеринов [549]. Хроматографию проводили в системе бензол — диэтиловый эфир (49:1). Смит и др. [550] использовали бензол в качестве подвижной фазы для ВЭЖХ на носителях, содержащих ионы серебра, смесей триацилглицеринов (включая позиционные изомеры 2-ненасыщенные-1,3-насыщенные и 1-ненасыщенные-2,3-насыщенные) (триацилглицерины детектировали рефрактометрически). Носитель партисил 5 имеет оптимальное содержание нитрата серебра — 5%.

4.4.3.2. Газо-жидкостная хроматография

ГЖХ — один из наиболее эффективных методов разделения смесей нейтральных липидов на индивидуальные соединения. В данном случае происходит разделение по нескольким параметрам: молекулярной массе, степени ненасыщенности, а в некоторых случаях — геометрической изомерии. Эффективность этого метода значительно возрастает при комбинировании его с ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра.

Триацилглицерины с длинными цепями, выделенные адсорбционной хроматографией, можно далее разделить по молекулярной массе (общему количеству атомов углерода) с помощью ГЖХ на коротких [(30—50) × 0,24 см] колонках, содержащих

1—3% неполярной жидкой фазы (метил- или фенилсилоксан) с использованием градиента температуры 200—300 °C (2—4 °C/мин) [91, 199, 551]. Такая процедура высокотемпературной ГЖХ стала рутинной при анализе природных жиров и масел [6, 16, 199, 552]. Применение длинных колонок улучшает разделение, однако при этом уменьшается выход длинноцепочечных глицеридов по сравнению с короткоцепочечными [6, 199]. Триацилглицерины с короткими цепями хорошо разделяются с помощью высокотемпературной ГЖХ на обычных колонках (180 см×0,25 см), содержащих указанные выше жидкие фазы [160]. Триацилглицерины разделяют также посредством капиллярной ГЖХ [553—557], однако на 20-метровых колонках относительный выход высокомолекулярных триацилглицеринов достаточно мал; в данном случае также требуется применение водорода в качестве газа-носителя [553, 555]. В то же время на капиллярных колонках длиной 4—6 м с использованием гелия [554] или водорода [556] в качестве газов-носителей удалось получить очень хорошие результаты разделения и высокие выходы ацилглицеринов как с короткими, так и с длинными цепями (использовали градиент температуры 280—350 °C). В работе [551] было получено полное разделение триацилглицеринов, отличающихся на одно метиленовое звено, на коротких капиллярных колонках, но разрешение лишь незначительно отличалось от полученного ранее на коротких насадочных колонках.

Монсейни и др. [554] опробовали короткие капиллярные колонки при различных условиях хроматографии нейтральных ацилглицеринов. Гроб и др. [555] сообщили о разделении большой группы смесей триацилглицеринов на капиллярной колонке с OV-1 длиной 14 м с использованием водорода в качестве газа-носителя (диапазон температуры 240—340 °C). Пробы в гексане вводили на колонку при температуре 60 °C. ГЖХ на капиллярных колонках дает возможность получить большую информацию, чем ГЖХ на обычных насадочных колонках, хотя колонки первого типа и не позволяют разделить триацилглицерины с одинаковым числом атомов углерода. Персилилированные колонки, покрытые неполярной силиконовой смазкой, можно использовать более года после проведения сотен анализов. При хроматографии природных триацилглицеринов как на капиллярных, так и на насадочных колонках наблюдается уширение пиков вследствие более раннего выхода с колонки ненасыщенных соединений по сравнению с насыщенными с тем же числом углеродных атомов. При этом не достигается разделения ненасыщенных и насыщенных триацилглицеринов. Уширение пиков не наблюдается, если образец был предварительно прогидрирован [199]. Гидрирование также используют для предотвращения гермического расщепления высоконенасыщенных соединений [199, 558].

Желательно вначале проводить ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, а затем — ГЖХ для разделения триацилглицеринов одинаковой степени ненасыщенности по числу атомов углерода [558]. Присутствие остатков жирных кислот с разветвленной цепью в молекуле триацилглицерина приводит к уменьшению времени удерживания этих соединений, а также уширению пиков и появлению «плечей» у пиков [559]. Триацилглицерины, в состав которых входят жирные кислоты с циклопентановым кольцом, элюируются значительно позже их аналогов, содержащих жирные кислоты с прямой цепью; это может быть использовано при разделении подобных соединений [559].

С помощью ГЖХ можно легко разделить триацилглицерины, содержащие ацетоксикислоты [560]. Триацилглицерины, содержащие эпоксикислоты, можно фракционировать посредством ГЖХ как в немодифицированном состоянии, так и в виде 1,2-диоксолановых производных [561]. 1,3-Диоксолановые производные, получаемые конденсацией эпокситриацилглицеринов с циклопентаном в присутствии трифторида бора, термически устойчивы, благодаря чему можно одновременно проводить разделение немодифицированных триацилглицеринов и их производных. Следует отметить, что эстолиды при ГЖХ в стандартных условиях остаются связанными с неподвижной фазой [199, 560].

ГЖХ может быть использована для разделения алкилацилглицеринов по молекулярной массе [562]. Поскольку эти липиды содержат на один карбонильный атом кислорода меньше, они имеют меньшее время выхода, чем соответствующие триацилглицерины, примерно равное времени выхода триацилглицеринов, содержащих на одно метиленовое звено меньше, чем соответствующие алкилдиацилглицерины. Разделение алкилдиацилглицеринов на индивидуальные соединения сравнимо с получаемыми для триацилглицеринов с длинными цепями. Индивидуальные тризамещенные алкилацилглицерины с одинаковым числом атомов углерода, но содержащие разное количество О-алкильных групп, имеют различные времена выхода. В общем случае добавление одной простой эфирной связи равносильно уменьшению длины цепи на одно метиленовое звено. Так, эфиры глицерина, имеющие 48 атомов углерода, элюируются в следующем порядке: трипальмитил-, 1,2-дипальмитил-3-пальмитоил-, 1-пальмитил-2,3-дипальмитоил- и трипальмитоилглицерины [6]. Как и в случае триацилглицеринов, при ГЖХ алкилацилглицеринов, содержащих разветвленные или ненасыщенные жирные кислоты, происходит уширение пиков, а также появляются «плечи» у этих пиков, если концентрация разветвленных триацилглицеринов достаточно велика [563].

Триацилглицерины с короткими цепями можно разделять по

степени ненасыщенности и содержанию атомов углерода с помощью ГЖХ при умеренных температурах на тонкой пленке неполярной фазы. Так, триацилглицерины, содержащиеся в дистилляте коровьего молочного жира, были разделены на большое число индивидуальных соединений посредством ГЖХ на 3% EGSS-X [160] и силар-5CP [564]. При этом наблюдалась сложная картина разделения со множеством частично перекрывающихся пиков. Такое перекрывание обусловлено присутствием в пробе высокой концентрации масляной, капроновой и каприловой кислот, которые достаточно полярны, чтобы проявить сильное сродство к полярной жидкой фазе.

Такаги и Итабаши [524] сообщили о попытке разделения триацилглицеринов по степени ненасыщенности и числу атомов углерода на колонке с силаром-10С. Хотя температурный режим, при котором проводили хроматографию, находился в предельно допустимом для данной колонки диапазоне, было получено хорошее разделение триацилглицеринов, содержащих от одной до четырех двойных связей в остатках жирных кислот и состоящих из 36—54 атомов углерода. Полученные в этой работе данные свидетельствуют в пользу того, что на капиллярных колонках с неподвижной фазой типа силар-10С можно получить полное разделение триацилглицеринов по степени ненасыщенности и числу атомов углерода в остатках жирных кислот.

ГЖХ позволяет разделить *sn*-1,2(2,3)- и 1,3-диацилглицерины, а также их алкилацильные, алкен-1-илацильные аналоги и диалкилглицерины. На коротких колонках с неполярной жидкой фазой, применяемой для разделения триацилглицеринов, можно разделять триметилсилильные [565, 566], *трет*-бутилдиметилсилильные [537, 567] и ацетильные [536, 568] производные, а также свободные дизамещенные алкилацилглицерины [566] по числу атомов углерода в молекуле. Однако на таких колонках плохо разделяются позиционные изомеры ацетоглицеринов [569], бутироглицеринов [570, 571] и ацетатов диацилглицеринов [16]. Поскольку такие соединения имеют небольшую молекулярную массу, их разделение проводят при температуре ниже 300 °С.

Лонинджер и Никифоров [572] сообщили об анализе ТМС-эфиров 1,2- и 1,3-диацилглицеринов с помощью ГЖХ, которую проводили в диапазоне температур от 240 до 300 °С на 12-метровых колонках с жидкой фазой SE-30 и с использованием водорода в качестве газа-носителя. Подобно триацилглицеринам, ненасыщенные диацилглицерины имеют время выхода с колонки, несколько меньшее чем время выхода соответствующих насыщенных аналогов, что приводит к небольшому уширению пиков и образованию у них «плечей». На колонках с неполярной жидкой фазой не удается разделить насыщенные и ненасыщенные

диацилглицерины. Поэтому необходимо предварительно проводить ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, с целью разделения диацилглицеринов по степени ненасыщенности [536]. Сочетание такой ТСХ с ГЖХ ацетильных производных широко применяется для разделения диацилглицеринов, полученных из диацилглицеринсодержащих фосфолипидов [536, 542, 543, 573—577]. Следует отметить, что пики, соответствующие ТМС-эфирам, можно разделять также на коротких колонках с неполярной жидкой фазой. Пики ТМС-эфиров диацилглицеринов перекрываются с пиками, соответствующими диалкилглицеринам, имеющим в цепи на два метиленовых звена меньше, однако при этом алкилацилглицерины хорошо отделяются от диацилглицеринов [545, 578]. Для разделений такого типа удобны ацетильные производные, поскольку смеси диалкил-, алкилацил- и диацилглицеринов или диацил-, алкилацил и алк-1-енилацилглицеринов легко разделяются в виде ацетатов. Как и в случае триацилглицеринов, при ГЖХ диацилглицеринов не наблюдается значительного размывания зон, что проявляется на хроматограмме в виде узких пиков. Разрешение можно увеличить путем проведения предварительного гидрирования [16].

На обычных колонках для ГЖХ, содержащих тонкие пленки полярной жидкой фазы (3%), такой, как этиленгликольсукцинат [579], циклогександиметилсукцинат [580] и силар-5СР [581], можно достаточно эффективно разделять ненасыщенные и насыщенные диацилглицерины и соответствующие им алкилацилглицерины в форме ТМС-эфиров. На таких колонках было достигнуто разделение диацилглицеринов, в состав которых входят жирные кислоты с 16 и 18 атомами углерода, как насыщенных, так и содержащих до трех двойных связей. Не разделялись лишь ТМС-эфиры олеоиллинолеил- и дилинолеилглицерины, а ТМС-эфиры стеароиллинолеил- и диолеилглицеринов, так же как 1-стеароил-2-линолеил- и 1-пальмитоил-2-арахидоноил-*sn*-глицерины были разделены лишь частично [6]. Не удалось также разделить энантимеры и позиционные изомеры, такие, как ТМС-эфиры 1-олеил-2-линолеил- и 1-линолеил-2-олеил-*sn*-глицеринов.

Дайер и Клопфентайн [582] получили хорошее разрешение насыщенных и ненасыщенных диацилглицеринов в виде ТМС-производных с помощью ГЖХ на колонке с 10%-ным силаром-10С при постоянной температуре. На колонке диаметром 3 мм и длиной 2,5 м было получено полное разрешение пиков, соответствующих диацилглицеринам структуры 32:0—38:4. Однако соединения с формулой 40:6 не элюировались с колонки.

Итабаши и Такаги [541] получили очень хорошее разделение диацилглицеринов, начиная от дипальмитат- и кончая дилиноленоатглицеринами, с помощью ГЖХ на 1,5-метровых колонках,

содержащих 3% силара-10С и с использованием градиента температур 180—270 °С. (Диацилглицерины подвергали хроматографии в форме ТМС-производных.) Эти авторы сравнивали хроматографическое поведение ацетатов и ТМС-производных диацилглицеринов при использовании различных типов жидких фаз: силар-5СР, силар-7GP, силар-10С и OV-275 (содержание жидкой фазы 3—5%). Наилучшее разделение ТМС-производных диацилглицеринов, получаемых из наиболее часто встречающихся растительных масел и природных жиров, было получено при ГЖХ на колонках с жидкой фазой SP-2330 при постоянной температуре (250—270 °С) [583]. В некоторых случаях использование ТМС-производных позволяет разделить позиционные изомеры, которые не удается разделить в форме ацетатов.

Моноацилглицерины в форме ацетатов [555, 584], изопропилиденовых производных [585], триметилсилильных [552, 586] и трет-бутилдиметилсилильных [567] эфиров легко разделяются на обычных неполярных колонках по молекулярной массе. Моноацил- и моноалкилглицерины можно достаточно эффективно разделить в форме ТМС-эфиров [584], ацетатов [584], трифтор-ацетатов [546] и изопропилиденовых производных [585].

Разделить моноацилглицерины с хорошими выходами на индивидуальные соединения можно с помощью хроматографии на колонках с такими полярными неподвижными фазами, как EGSS-X и силар-5СР. На колонках с EGSS-X моноацилглицерины разделяют обычно в форме ацетатов [584], ТМС-эфиров [540] и изопропилиденовых производных [585, 587, 588], а на колонках с неподвижной фазой силар-5СР — в форме ацетатов [584] или ТМС-эфиров [584]. Следует отметить, что жидкая фаза силар-5СР имеет большую термическую устойчивость, чем другие жидкие фазы, и поэтому более предпочтительна для работы при повышенных температурах. Очень хорошее разделение моноацилглицеринов в форме ацетатов или ТМС-производных по степени ненасыщенности и молекулярной массе можно получить при использовании в качестве жидкой фазы силара-10С [541]; последний даже более термически устойчив, чем силар-5СР. Поскольку в молекуле моноацилглицеринов и их производных содержится лишь один остаток жирной кислоты, то при ГЖХ эти соединения ведут себя сходно с метиловыми эфирами свободных жирных кислот и их производных. Ацетаты и ТМС-эфиры моноалкил- и моноалкилглицеринов, а также метанбораты моноалкилглицеринов [528, 590] легко разделяются по длине цепи [166] и по степени ненасыщенности [584, 589]. Подробное рассмотрение ГЖХ алкенил-, алкил- и ацилглицеринов на колонках с полярной фазой можно найти в работе [16].

С помощью ГЖХ можно разделять простые эфиры глицерина, имеющие заместители в алифатической цепи [203, 204, 591].

В работах [204, 591] 1-(9/10-окси)октадецил- и 1-(11/12-окси)-алкилглицерины в форме ТМС-, ТМС/изопропилиденовых и ацетат/изопропилиденовых производных разделяли на 183-сантиметровых колонках с 10% EGS-X при температуре 200 °С. А на колонках с 10% SP-1000 были разделены различные 1-О-(2-оксиалкил)- и 1-О-(2-кетоалкил)глицерины в форме ацетат/изопропилиденовых производных [203]. Алкил- и 2-метоксиалкилглицерины разделяли на колонках с 1%-ным апиезоном L, содержащим 0,1% полиэтиленгликоля при температуре 218 °С и на колонках с 1% EGS при температуре 194 °С [548]. Ненасыщенные соединения имели меньшее время удерживания при ГЖХ на колонках с жидкой фазой апиезон L, а при использовании колонок с EGS наблюдалась обратная картина. На 190-сантиметровых колонках с 18% HI-EFF-2BP (EGS) были разделены четыре изомера, образовавшиеся в результате катализируемой кислотой реакции циклизации 1-О-*цис*-алкен-1-ил-*sn*-глицерина, *цис*-2-алкил-5-окси-1,3-диоксана, *транс*-2-алкил-5-окси-1,3-диоксана, *цис*-2-алкил-4-оксиметил-1,3-диоксана и *транс*-2-алкил-4-оксиметил-1,3-диоксана [592]. На колонках с такими жидкими фазами, как SE-30, EGSS-X и EGS, можно отделить 1-*S*-алкилглицерины от соответствующих 1-О-алкилглицеринов (для хроматографии используют изопропилиденовые производные указанных соединений) [593].

Отте и Чунг [208] сообщили о разделении смесей 2-*N*-ацилсеринолов в форме ТМС-эфиров с помощью ГЖХ на колонках с 1% OV-1 при постоянной температуре (210 °С). В работе [594] разделяли воски на индивидуальные соединения путем ГЖХ на колонках с 5% силара-10С при температуре 200—260 °С.

4.4.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Еще в 1967 г. Никелю и Приветту [595] удалось получить хорошее разделение триацилглицеринов на индивидуальные соединения с помощью обращенно-фазовой хроматографии на колонках с силанизированным целитом. В последующих работах [596—599] в качестве носителя для обращенно-фазовой хроматографии триацилглицеринов стал применяться оксиалкоксопропилсефадекс. Усовершенствованный метод разделения триацилглицеринов на колонках с этим носителем был описан Линдквистом и др. [600]. Этим авторам удалось получить хорошее разделение триацилглицеринов, содержащих от 9 до 54 атомов углерода, используя градиентное элюирование [линейный градиент, созданный из двух смесей растворителей: изопропанол — хлороформ — гептан — вода (115:15:2:35) и гептан — ацетон — вода (5:15:1)]. В этом случае ненасыщенные триацилглицерины имели время удерживания, меньшее чем время удерж-

живания соответствующих насыщенных соединений (и равное времени выхода соответствующих насыщенных триацилглицеринов, содержащих вместо каждой двойной связи на 1 или 2 метиленовых звена меньше).

Курстед и Сьёвалл [601, 602] на таких же колонках разделили 1,2-диацил-3-триметилсилил-*sn*-глицерины, используя в качестве элюента смесь ацетон—вода—гептан (87:13:10). С целью предотвращения гидролиза простой эфирной связи в элюент добавляли 1% пиридина. При разделении смеси 1,2-диацил-*sn*-глицеринов, полученных из фосфатидилхолинов печени крысы, на хроматограмме появлялись два главных пика, соответствующих диацилглицеринам с формулами 32:1, 34:2, 36:3 и 32:0, 34:1, 36:2 каждый, а также два минорных пика, соответствующих соединениям с формулами 38:6 и 32:2, 34:3, 34:4. Главный недостаток описанных процедур заключается в том, что они занимают много времени (например, хроматография триацилглицеринов, содержащих от 9 до 54 атомов углерода, требует 20 ч) и достаточно утомительны.

Быстрое разделение триацилглицеринов по степени ненасыщенности и длине цепи остатков жирных кислот было достигнуто с помощью ВЭЖХ на колонках с μ -бондапаком C_{18} с использованием смеси ацетонитрил—ацетон (2:1) в качестве элюента [603]. В случае насыщенных триацилглицеринов была получена линейная зависимость между числом атомов углерода и логарифмом удерживаемого объема (такая зависимость была ранее отмечена в случае распределительной хроматографии на обычных колонках [596]). Добавление каждой двойной связи в молекулу ненасыщенного триацилглицерина уменьшает значение удерживаемого объема до величины, соответствующей насыщенному триацилглицерину, содержащему на две метиленовые группы меньше. Полученные в результате хроматографии фракции были проанализированы методом ГЖХ. Было установлено, что триацилглицерины этих фракций содержат от 32 до 52 атомов углерода. При использовании метанолсодержащего растворителя удается достичь частичного разделения триацилглицеринов с одинаковым числом атомов углерода, в том числе частичного разделения трипальмитоил- и триолеилглицеринов.

При хроматографии тристеароилглицеринов и глицеридов, содержащих другие высшие насыщенные жирные кислоты, возникает проблема растворимости. Иногда такие соединения выпадают в осадок при введении пробы. В качестве примера разделения триацилглицеринов природных масел можно привести работу, в которой анализировали липиды соевого масла. На хроматограмме были получены семь-восемь пиков, соответствующих триацилглицеринам с 54 атомами углерода и 2—8 двойными связями в молекуле, триацилглицеринам, содержащим

52 атома углерода и 1—6 двойных связей, а также триацилглицеринам с 50 атомами углерода, насыщенным и имеющим до двух двойных связей.

В 1975 г. Пей и др. [604] продемонстрировали эффективность обращенно-фазовой распределительной хроматографии как метода разделения триацилглицеринов с использованием 60%-ного водного раствора метанола в качестве элюента. Позднее Безард и Оэдраого [605] описали эффективную процедуру разделения природных триацилглицеринов с помощью изократической ВЭЖХ в системе ацетонитрил — ацетон (43 : 58). В результате разделения триацилглицеринов арахисового масла было получено восемь фракций, которые были собраны и идентифицированы как триацилглицерины с обобщенными коэффициентами распределения, рассчитанными с учетом допущения, что двойная связь эквивалентна уменьшению длины цепи остатка насыщенной жирной кислоты на два атома углерода (два метиленовых звена). Исключение составила последняя фракция, для которой получалась формула 55 : 02 вместо 56. Присутствие окси- и эпоксигрупп значительно уменьшает время удерживания [603, 606]. Так, триверноилглицерины элюируются с колонки гораздо раньше незамещенных триацилглицеринов [606]. Триацилглицерины, содержащие гидроксильированные жирные кислоты, такие, как рицинолевая кислота, имеют время выхода, несколько меньшее, чем сами триацилглицерины [603]. Наличие тройной связи и циклопропенильной группы вызывает примерно такое же изменение значения времени выхода, как и наличие двойных связей [603].

Полиацилглицерины, или эстолиды, содержащие один, два или три остатка моногидроксильированных жирных кислот, можно разделить с помощью ВЭЖХ на нормальной и обращенной фазе [206]. В обоих случаях первыми элюируются триацилглицерины, а затем тетра-, пента- и гексатриацилглицерины. Можно далее проводить разделение каждой из полученных фракций по степени ненасыщенности и содержанию атомов углерода.

Разделение проводилось на колонке с μ -бондапаком C_{18} (300×7,8 мм) при скорости подачи элюента (ацетонитрил — ацетон, 2 : 1) 1 мл/мин [206]. Для разделения триацилглицеринов использовалась также специальная колонка Triacylglycerol column (Waters Associates); условия хроматографирования следующие: скорость подачи элюента 2 мл/мин, элюент ацетонитрил — тетрагидрофуран (3 : 1).

Адсорбционную ВЭЖХ проводили на колонке с μ -порасилом [элюентом служила смесь изеооктан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (98 : 2 : 1), скорость подачи элюента 1 мл/мин]. ВЭЖХ на колонках с μ -бондапаком C_{18} и Triacylglycerol column дает примерно одинаковые результаты. На колонке с μ -пораси-

лом достигается примерно такое же разделение полиацилглицеринов различных фракций, причем полиацилглицерины, содержащие жирные кислоты с длинной цепью, имеют большее время удерживания. Однако профиль элюирования, получаемый при хроматографии на колонке с μ -порасилом, обратен наблюдаемому при хроматографии на колонках с μ -бондапаком C_{18} и Triacylglycerol column. При хроматографии на последних двух колонках полиацилглицерины с одинаковым числом ацильных остатков, но содержащие более длинные и менее насыщенные жирные кислоты, имеют меньшее время удерживания. Вещества, элюирующиеся первыми с Triacylglycerol column, элюируются последними с колонки с μ -порасилом. В работе [607] детально обсуждается влияние длины цепи и степени ненасыщенности остатков жирных кислот на хроматографическое поведение триацилглицеринов при ВЭЖХ. В настоящее время требуется разработка методики ВЭЖХ для более сложных эстолидов, содержащих свободные гидроксильные группы.

Фаллон и Шимицу [608] с помощью ВЭЖХ фракционировали триацилглицерины тлей, содержащие сорбиновую кислоту. Такие триацилглицерины, различающиеся лишь двумя метиленовыми звеньями, легко разделяются с помощью адсорбционной хроматографии на колонке с зорбакс-сил (Du Pont). Эфиры сорбиновой кислоты поглощают в УФ-области, что облегчает детектирование.

4.4.4. Церамиды

Природные свободные церамиды, получаемые из природных сфинголипидов, разделяют с помощью ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, на фракции с одинаковой степенью ненасыщенности, а с помощью ГЖХ — по молекулярной массе. Метод ВЭЖХ позволяет провести разделение по обоим указанным параметрам. Перед проведением ВЭЖХ церамиды предварительно фракционируют с помощью адсорбционной хроматографии по содержанию в молекуле гидроксильных групп, а затем переводят в соответствующие производные.

4.4.4.1. Адсорбционная хроматография

Карлсон и Пашер [609] провели детальное исследование церамидов методом ТСХ. Молекула церамида может содержать от 2 до 14 оксигрупп (две-три в остатке аминокспирта и до одной — в остатке жирной кислоты). По числу и расположению присутствующих оксигрупп церамиды можно разделять с помощью ТСХ на силикагеле или силикагеле, пропитанном такими веществами, как тетраборат или арсенит натрия, образующими

комплексы с диолсодержащими соединениями. Силикагель, пропитанный боратом натрия, можно также использовать для выделения керамидов, содержащих *транс*-двойную связь в положении 4 алифатической цепи аминоспирта. При ТСХ на таком силикагеле насыщенные керамиды мигрируют быстрее ненасыщенных. Причина этого явления не выяснена [610].

На большом числе синтетических керамидов Карлсон и Пашер [609] показали, что на пластинках силикагеля, содержащих арсенит, используя систему хлороформ — метанол (19:1), керамиды можно разделить на четыре фракции: диоксиаминоспирт — незамещенная жирная кислота и триоксиаминоспирт — гидроксилсодержащая жирная кислота. Первые две фракции можно далее разделять на содержащие и не содержащие *транс*-двойную связь в положении 4 алифатической цепи аминоспирта на пластинках силикагеля, пропитанных солями борной кислоты. Достигается разделение и 2-ацетоксизомеров, за исключением керамидов, содержащих триоксиаминоспирт. Однако полностью ацетилированные производные в такой системе не разделяются. Как правило, керамиды с триоксиаминоспиртами мигрируют медленнее керамидов с диоксиаминоспиртами. Для соответствующих полностью ацетилированных производных наблюдается обратная картина. Керамиды с короткими и длинными цепями можно разделять на силикагеле в системе хлороформ — метанол (9:1); при этом соединения с более длинной цепью двигаются быстрее. В этом случае достигается полное разделение керамидов с длиной цепи жирной кислоты 18—24 атома углерода. Ацетилирование не ухудшает разрешения. Разделение таких керамидов можно также выполнить на колонках с кремниевой кислотой [611]. Буорс и Гиньяр [612] использовали смесь хлороформ — метанол (9:1) в качестве подвижной фазы для фракционирования керамидов на пластинках силикагеля, пропитанных солями борной кислоты, а Баллио и др. [613] провели очистку керамидов на обычных пластинках силикагеля в системе бензол — ацетон (1:1). Ваннам и Радин [614] нашли значения R_f для гомологичных амидов DL-2-оксикислот и DL-сфингозинов. Эти авторы сообщают, что было получено хорошее разделение соединений с различной длиной цепи в системе хлороформ — метанол — вода (155:25:28).

4.4.4.2. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

Керамиды, содержащие одинаковое число оксигрупп, можно фракционировать по числу двойных связей в остатке жирной кислоты, а также по числу *цис*-двойных связей в цепи аминоспирта на пластинках, пропитанных нитратом серебра [615—

617]. Присутствие *транс*-двойных связей не влияет на разделение. Проведение предварительного ацетилирования оксигрупп в молекуле церамида уксусным ангидридом в пиридине позволяет получать наилучшие результаты. Наиболее эффективной элюирующей системой оказалась смесь хлороформ — бензол — ацетон (8:2:1) [615, 616].

Увеличение числа двойных связей в молекуле церамида уменьшает ее хроматографическую подвижность. Трехкратным элюированием смесью хлороформ — метанол (19:1) можно разделить свободные церамиды на индивидуальные соединения. При использовании для ТСХ *трет*-бутилдиметилсилильных эфиров церамидов удается достичь хорошего разделения этих соединений по степени ненасыщенности [556]. *трет*-Бутилдиметилсилильные производные имеют высокую химическую стабильность и позволяют получать идеальные картины фрагментации при масс-спектрометрии.

Для препаративного разделения *трет*-бутилдиметилсилильных производных церамидов природных сфингомиелинов используется ТСХ на пластинках силикагеля G, содержащего 20% нитрата серебра, при элюировании сначала хлороформом, а затем смесью хлороформ — метанол (200:3). Разделение основано на том, что церамиды различаются по степени ненасыщенности как аминокспирта, так и жирной кислоты.

4.4.4.3. Газо-жидкостная хроматография

Церамиды, предварительно фракционированные с помощью ТСХ, можно разделить на индивидуальные соединения высокотемпературной ГЖХ в условиях, используемых для ГЖХ диацилглицеринов. Церамиды подвергают хроматографии как в свободной форме [617], так и в форме ТМС-эфиров [566, 615, 618—620], ацетатов [566], простых полностью метиловых эфиров [621]. Разделение осуществляется по одному параметру — по длине алифатической цепи. В работе [615] ТМС-производные церамидов разделяли на U-образных стеклянных колонках (1,2 м×3 мм), содержащих 1% OV-1 при температуре 270°C. Сходное разделение было получено на коротких (50 см×2 мм) колонках с полярной жидкой фазой, используемых для разделения триацилглицеринов. Использование градиента температуры увеличивает выход высокомолекулярных компонентов, не ухудшая разрешения. На указанных колонках удается достичь хорошего разрешения и свободных церамидов [617].

Каспаррини и др. [619] разделили и элюировали с высоким выходом ТМС- и гептафторбутирилпроизводные церамидов, содержащие 2-оксикислоты. ГЖХ проводили на колонках длиной 2,7—3,6 м, содержащих 1% SE-30. Был использован градиент

температуры (скорость создания градиента $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), начиная с 250°C (для гептафторбутиратов) и 270°C (для ТМС-эфиров). Прекрасное разделение керамидов было получено при использовании *трет*-бутилдиметилсилильных производных, имеющих хорошие свойства для масс-спектропии [622]. Разделение ТМС- и *трет*-бутилдиметилсилильных производных керамидов значительно улучшается при использовании капиллярных колонок длиной 5—15 м, содержащих неполярную жидкую фазу [623]. В этих условиях достигается практически полное разделение керамидов, в состав которых входят остатки насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот из 24 атомов углерода.

4.4.4.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Сугита и др. [624] выбрали условия бензоилирования керамидов, содержащих обычные и гидроксिलированные жирные кислоты, и показали, что эти производные можно использовать для эффективного и чувствительного анализа методом ВЭЖХ на колонке с зипаксом (Du Pont) при элюировании 0,05%-ным раствором метанола в *n*-пентане или 2,5%-ным раствором этилацетата в гексане. Ивамори и Мозер [625] использовали сходную систему ВЭЖХ для анализа керамидов в моче при болезни Фарбера. Позже Ивамори и др. [626] разделили бензоильные производные керамидов, содержащих гидроксिलированные и негидроксилированные жирные кислоты, используя в качестве элюентов смеси гексана и этилацетата (94:6, 95:5, 97:3). Сообщалось о разделении индивидуальных керамидов в виде бензоил- и нитробензоилпроизводных с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе на колонках с оксидом кремния [627]. Немодифицированные керамиды, полученные из сфингомиелинов, были разделены на 10 соединений на колонке с обращенной фазой; разделение было основано главным образом на различиях в молекулярной массе и степени ненасыщенности, причем более короткоцепочечные и менее насыщенные керамиды элюировались раньше. Керамиды, содержащие жирные кислоты с одной двойной связью, элюировались вместе с керамидами, содержащими насыщенные жирные кислоты, имеющими на три атома углерода меньше. Однако эти соединения можно разделить с использованием методов хроматографии на носителях, содержащих ионы серебра, и обращенно-фазовой ВЭЖХ [628].

4.4.5. Глицерофосфолипиды и сфингомиелины

Глицерофосфолипиды и сфингомиелины удобнее всего анализировать после удаления полярных «головок» ферментативными или химическими методами. Например, фосфорилхолиновая часть холинсодержащих фосфолипидов может быть легко

удалена с помощью фосфолипазы С [544, 629]. Этот фермент может быть также использован для дефосфорилирования фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина [630], хотя эта реакция проходит с меньшей скоростью, чем в случае фосфатидилхолина. Ферментативный гидролиз можно использовать также и для анализа алкилацил- и алкен-1-илацилглицерофосфолипидов [544, 631]. Нейтральные липиды, получаемые из фосфолипидов, анализируют, как описано выше в разд. 4.4.3.

Однако можно разделять и идентифицировать нативные фосфолипиды и фосфолипиды с химически модифицированными полярными группами, не прибегая к расщеплению молекулы фосфолипида, с последующим анализом составляющих ее компонентов.

4.4.5.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

Нативные фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидилинозиты можно разделить на индивидуальные соединения по содержанию в молекуле двойных связей методом ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра. Так, фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины могут быть разделены на фракции, содержащие фосфолипиды с остатками насыщенных, моно-, ди-, три- и тетраеновых жирных кислот, причем фосфатидилэтаноламины содержат обычно и фракцию гексаеновых соединений [632, 633]. В указанных работах для такого фракционирования использовали систему хлороформ — метанол — вода (60:35:4). В сходной элюирующей системе хлороформ — метанол — вода (65:35:5) фосфатидилинозиты разделяли на фракции насыщенных, моно-, ди-, три- и тетраеновых соединений [634]. Однако в этом случае не наблюдалось полного разделения соответствующих диацилглицеринов. Так, не разделялись алкилацил-, алкенилацил- и диацилглицерофосфолипиды [1]. Нативные фосфатидилхолины и фосфатидилглицерины можно разделить на индивидуальные соединения методом ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:4) [635, 636]. Диметиловые эфиры фосфатидных кислот легко разделяются посредством ТСХ на носителях с ионами серебра по содержанию двойных связей и их расположению в молекуле [155]. Смеси таких соединений, содержащих до 12 двойных связей, можно разделить в системе хлороформ — метанол — вода (90:10:1) [539].

Для целей последующей идентификации индивидуальных фосфатидных кислот получали их диметиловые эфиры путем обработки диазометаном. Другие глицерофосфолипиды могут быть превращены в фосфатидные кислоты гидролизом фосфолипазой D [637]. Диазометанолиз позволяет получать диметило-

вые эфиры фосфатидных кислот прямо из фосфатидилсерина [638]. Диазометилирование также представляет собой подходящий способ защиты фосфатных групп в алкилацил- или алкенилацилглицерофосфатах. Полярные группы фосфатидилэтанол-аминов можно достаточно эффективно защитить путем N-динитрофенилирования фосфатидилэтанол-амина [639].

ТСХ на носителях с ионами серебра позволяет разделить диметил-овые эфиры фосфатидных кислот в соответствии с числом, геометрией и положением двойных связей; для этой цели используют элюирующую смесь хлороформ — метанол (49:1). Для разделения динитрофенилпроизводных фосфатидилэтанол-амина и фосфатидилсерина используют противоточное распределение [640]. С этой целью карбоксильную группу метилируют путем кратковременной обработки диазометаном. Динитрофенилфосфатидилэтанол-амины [641] и динитрофенилфосфатидилсерина [640] разделяются в распределительной системе между петролевым эфиром и 85%-ным водным раствором этанола. Фосфатидилинозиты можно разделить на индивидуальные соединения с помощью ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, после ацетилирования инозитной части для уменьшения полярности молекулы [642]. Модифицированные фосфатидилинозиты можно разделить на фракции насыщенных и моно-, ди-, три-, тетра- и полиеновых соединений в системе хлороформ — ацетон (3:1 и 1:1).

Поскольку насыщенные и моноеновые фосфатидилинозиты не разделяются этим методом, их подвергают окислению смесью перманганата с периодатом, а затем проводят ТСХ для выделения смеси насыщенных фосфатидилинозитов [643]. Шоу и Боттино [644] и Боттино [645] фракционировали полиненасыщенные фосфатидилхолины и фосфатидилэтанол-амины методом ТСХ в системе хлороформ — метанол — 1-пропанол — 0,5%-ная уксусная кислота (55:30:5:7). Особенность этой методики заключалась в том, что хроматографию проводили при температуре -10°C в течение 14—16 ч для фосфатидилхолина и при температуре 4°C в течение 11—12 ч для фосфатидилэтанол-амина.

Для разделения фосфатидилхолинов и фосфатидилэтанол-аминов на индивидуальные соединения применяют также хроматоды, пропитанные нитратом серебра [646]. Хроматографию проводят в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:3).

4.4.5.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В одной из первых успешных работ по фракционированию фосфатидилхолинов методом жидкостной хроматографии Кинг и Клементс [647] разделяли продукты присоединения ацетата ртути(II) к ненасыщенным фосфатидилхолинам и одновременно

отделяли их от насыщенных фосфатидилхолинов на колонке с сефадексом LH-20. Авторы использовали градиентное элюирование смесью хлороформ — метанол (1:1), содержащей 0,01—0,1% ледяной уксусной кислоты. Были выделены четыре вида фосфатидилхолинов, выход вещества составил 65—90%, а воспроизводимость результатов — около 10%. Арвидсон [648] провел разделение немодифицированных фосфатидилхолинов из яичного желтка на алкилированных производных сефадекса с использованием в качестве элюента смеси метанол — вода.

Однако описанные методы занимали много времени и не всегда были достаточно эффективными. Гораздо быстрее и эффективнее проводить разделение с помощью ВЭЖХ. Некоторые смеси фосфатидилхолинов и сфингомиелинов можно разделить адсорбционной ВЭЖХ. Так, этим методом были разделены 1,2-дипальмитоил и 1,2-дидокозо-13'-*цис*-еноилглицерин-3-фосфорилхолины и сфингомиелины с короткими и длинными цепями [234]. Способы более эффективного разделения более сложных смесей методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонках с μ -бондапаком C_{18} и Fatty Acid Column описаны Портером и др. [649]. Для хроматографии на колонке с μ -бондапак C_{18} в качестве элюента использовали смесь хлороформ — вода — метанол (1:1:10), а в случае Fatty Acid Column — смесь хлороформ — вода — метанол (10:19:70). Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра. Таким методом были фракционированы синтетические фосфатидилхолины на соединения со значениями эффективного содержания углерода от 28 до 36 и с 1—4 двойными связями в молекуле. Эффективное содержание атомов углерода определяется как общее число атомов углерода минус число двойных связей в молекуле фосфатидилхолина. Смесь фосфатидилхолинов яичного желтка была разделена с помощью описанного метода на основные компоненты со следующими формулами: 16:0, 18:1, 16:0, 18:2, 18:0, 18:2 и 18:0, 18:1. Сходным образом Кроуфорд и др. [650] разделили фосфатидилхолины сои на индивидуальные соединения посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с μ -бондапаком C_{18} и градиентным элюированием (91—95% метанола — вода), обнаружение проведено по поглощению при 206 нм. Разрешенные пики содержали компоненты, соответствующие соединениям со следующими значениями эффективного содержания атомов углерода: 18:3, 18:3, 18:2, 18:3, 18:2, 18:2, 16:2, 18:2, 18:1 18:2 и 18:0 18:2. Данный метод использовали также для выделения динолеоилфосфатидилхолинов из смеси с другими фосфатидилхолинами сои и их последующей очистки.

Оксисленные формы 18:2 18:2 фосфатидилхолинов, которые обнаруживали по поглощению при 234 нм, имели большее время удерживания, чем их незамещенные аналоги.

Портер и сотр. [504] применили ВЭЖХ на обращенной фазе для разделения продуктов окисления 1-пальмитоил-2-линолеил-фосфатидилхолина с использованием системы растворителей метанол — вода — хлороформ (10:1:1). Продукты окисления 1-стеароил-2-арахидоноилфосфатидилхолина были разделены в системе растворителей метанол — вода — хлороформ (50:6:5) на такой же колонке с обращенной фазой C_{18} .

Паттон и др. [88] сообщили о разделении смеси всех основных видов глицерофосфолипидов на 30—35 индивидуальных соединений с помощью обращенной-фазовой ВЭЖХ на колонках с ультрасфером ODS (Altex Scientific) при элюировании смесью метанол — вода — ацетонитрил (181:14:5), содержащей 20 мМ холинхлорида. Сравнимые результаты разделения фосфатидилхолинов были получены Смитом и Юнгвалла [89] на колонках с нуклеосилом-5- C_{18} при элюировании смесью метанол — 1 мМ фосфатный буфер (pH 7,4) (19:1). В обоих случаях детектирование проводили по поглощению при 205 нм.

4.4.6. Гликолипиды

Гликолипиды, включая полигексозилцерамиды, можно разделить на индивидуальные соединения с помощью ГЖХ на носителях, содержащих ионы серебра. Гликолипиды с короткими и длинными цепями можно частично разделить посредством жидко-жидкостной и адсорбционной хроматографии.

4.4.6.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра

В настоящее время не известна ни одна химическая реакция, в том числе катализируемая ферментами, в ходе которой избирательно гидролизовалась бы гликозидная связь в гликозилдиацилглицеринах или гликозилцерамидах, поэтому нельзя осуществить анализ этих соединений путем расщепления нативной молекулы и последующего определения составляющих ее компонентов. Однако смеси нативных гликолипидов различных классов могут быть разделены на фракции или индивидуальные соединения с помощью ТСХ на носителях с ионами серебра. Так, моногалактозилдиацилглицерины были разделены с помощью этого метода на отдельные фракции, содержащие соединения с различным числом двойных связей (от 1 до 6); в качестве системы растворителей была взята смесь хлороформ — метанол — вода (60:21:4) [651, 652]. Эта же система была использована Зиберцем и др. [653] для препаративной ТСХ на носителях, пропитанных нитратом серебра, с целью получения индивидуальных моногалактозил- и дигалактозилдиацилглицеринов.

Разделение улучшалось, если предварительно проводили ацетилирование свободных оксигрупп. Ацетильные производные разделяли в смеси хлороформ — метанол (197:3) [655].

Позднее Зиберц и др. [635] разделили на индивидуальные соединения смесь гликолипидов из мембран хлоропластов и тилакоидов. Авторы использовали для ТСХ на носителях, содержащих ионы серебра, следующие системы растворителей: хлороформ — метанол — вода (60:21:4) для разделения моногалактозилдиацилглицеринов; хлороформ — метанол — вода (65:35:4) для разделения дигалактозилдиацилглицеринов; хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (50:25:4:4) для разделения тригалактозилдиацилглицеринов и хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (25:15:4:2) для разделения тетрагалактозилдиацилглицеринов; для разделения сульфохинозилдиацилглицеринов использовали систему хлороформ — метанол — вода (65:25:4). Сорбент приготавливали следующим образом: пластинки, предварительно покрытые кизельгелем G, пропитывали нитратом серебра, опрыскивая их 10%-ным раствором AgNO_3 в ацетонитриле (из расчета 10 мл раствора на пластинку размером 20×20 см), затем активировали не менее 3 ч при 130°C . Разделение проводили при 4°C . В результате было получено прекрасное разделение соединений, содержащих от 0 до 6 двойных связей.

4.4.6.2. Газо-жидкостная хроматография

В работе [656] высокотемпературную ГЖХ ТМС-производных моно- и дигалактозилдиацилглицеринов (после их предварительного гидрирования) использовали для разделения соединений, отличающихся по молекулярной массе, причем условия разделения были те же, что и для разделения триацилглицеринов. Куксис [617] и Вильямс и др. [368], также используя метод ГЖХ, получили сходное разделение ТМС-эфиров моно- и дигалактозилдиацилглицеринов без предварительного гидрирования этих гликолипидов.

Нативные моногликозилцерамиды (цереброзиды) подвергали высокотемпературной ГЖХ после модификации свободных оксигрупп гексоз и алифатических остатков и образования ТМС-эфиров. Разделение указанных гликозидов происходило одновременно по длине цепи и по числу оксигрупп в остатках длинноцепочечных оснований и жирных кислот. Однако сигналы детекторов, воспроизведенные ГЖХ-самописцем, были достаточно сложны и не поддавались интерпретации без привлечения результатов масс-спектрометрии [657, 658].

Сходные результаты были получены Куксисом [617], который показал, что моно- и дигликозилцерамиды в форме ТМС-

производных могут быть легко разделены в соответствии с числом атомов углерода. В тесте на разрешающую способность хроматографической системы были получены, по-видимому, правильные значения времен удерживания для гликозилцерамидов, содержащих до шести гексозидных единиц, так же как и для соответствующих продуктов распада (пиролиза).

4.4.6.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Условия ВЭЖХ, выбранные с целью обнаружения производных различных гликолипидов (обнаружение пербензоильных производных при 230 нм), позволяют провести полное разделение только липидов различных классов. Однако некоторые соединения, отличающиеся по длине цепи входящих в них остатков жирных кислот, можно частично разделить в этих условиях.

Нонака и Кишимото [659] описали методику разделения глюко- и галактоцереброзидов с помощью ВЭЖХ на колонке с сферисорбом (диаметр частиц 5—10 мкм) с использованием градиентного элюирования (0,5—10%-ный раствор пропанола-2 в гексане) и детектированием по поглощению при 230 нм. Гликолипиды предварительно не очищали и подвергали хроматографии в виде бензоатов. Данный метод позволял разделять цереброзиды и сульфатиды, содержащие гидроксильные и негидроксильные жирные кислоты. На графике зависимость времени удерживания гомологичных соединений от числа атомов углерода в остатке жирной кислоты выражалась прямой линией. Эта система ВЭЖХ была довольно успешно применена для разделения цереброзид-III-сульфатидов [660].

С помощью ВЭЖХ можно достичь субфракционирования ганглиозидов, о чем свидетельствует наличие «плечей» у пиков, соответствующих GM_3 и GM_4 [382]. Хотя эти «плечи» могут быть результатом неполного бензоилирования или распада продуктов, количественная оценка компонентов реакционной смеси не подтверждает этого предположения. Более вероятно, что эти «плечи» отражают молекулярную гетерогенность. Показано, что различия в составе жирных кислот GM_3 вызывают изменения в хроматографическом поведении этих соединений при ТСХ. GM_3 из опухоли мозга при ТСХ разделяются на две фракции, что происходит вследствие различий в остатках длинноцепочечных (C_{22} и C_{24}) и короткоцепочечных (C_{16} и C_{18}) жирных кислот [661].

Подобное явление наблюдалось и для GM_3 из печени человека, которые разделяются при ТСХ вследствие различий в составе жирных кислот [374]. Для описанных случаев на хроматограммах верхняя полоса отвечает главным образом ганглиозидам с обычными жирными кислотами с длинной цепью, в то

время как нижняя полоса — смеси ганглиозидов с гидроксильными жирными кислотами и незамещенными жирными кислотами с короткой цепью. Сходные данные были получены и для GD₃-ганглиозидов из глазного нерва быка [662].

4.5. Определение общего состава липидов

Целью хроматографии липидов являются разделение липидов различных классов и последующее получение индивидуальных соединений с целью их идентификации и количественного анализа. В ходе изучения липидов с помощью хроматографических методов выяснилось, что многие организмы, ткани, клетки и субклеточные компоненты имеют характерный состав липидов, который можно определить, не прибегая к полному разделению и получению индивидуальных соединений. Количественный анализ липидов, полученных в результате частичного разделения первичного экстракта, часто является достаточным для установления источника, из которого были выделены эти липиды, и выяснения, с каким метаболическим состоянием (нормальным или аномальным) связан данный состав этих соединений. Практически все хроматографические методы могут быть применимы для выполнения этой задачи, однако более предпочтительны те, которые сочетают быстрое разделение с эффективной количественной оценкой. Такой подход имеет широкое применение — от определения полного состава липидов плазмы до характеристики индивидуальных липидов бактерий, основанной на анализе метиловых эфиров жирных кислот этих липидов или продуктов пиролиза последних.

4.5.1. Тонкослойная хроматография

Для целей качественного анализа липидов первичного экстракта наиболее полезным является метод ТСХ. Однако таким методом даже с помощью самых тщательно разработанных процедур не удастся осуществить количественную оценку фракций липидов. Трансметиловое эфиром различных жирных кислот с последующим количественным анализом метиловых эфиров жирных кислот методом ГЖХ дает удовлетворительные результаты, но анализ занимает много времени [45, 663—668]. Этот метод широко применяют для количественной оценки соотношения глицеролипидов в различных фракциях, полученных с помощью ТСХ, а также для дальнейшей характеристики состава этих фракций. Опубликованы многочисленные работы, в которых указанные методы были использованы для анализа липи-

дов человека [668, 669] и животных [670—672], а также для характеристики липидов различных тканей, органов [673, 674] и субклеточных фракций [656, 675—677].

Прекрасная методика определения общего состава липидов плазмы или сыворотки с использованием ТСХ включает двухступенчатое элюирование сначала смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (9:1) и затем смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (400:100:1) в одном и том же направлении (элюирование второй системой начинают после прохождения фронтом растворителя первой системы 5 см). В этом случае полярные липиды, остающиеся на старте, состоят почти полностью из фосфолипидов [678, 679]. Содержание эфиров холестерина, триацилглицеринов, свободных жирных кислот и холестерина, а также фосфолипидов определяли карбонизацией с последующей денситометрией [680, 681].

Полле и др. [682] описали метод микроанализа липидов мозга, основанный на двумерной ТСХ, с использованием многократного элюирования. Первичный экстракт липидов сначала подвергали ТСХ в системе хлороформ — метанол — вода (35:15:2), что позволяло разделить липиды на фракции, содержащие соединения различных классов. Однако исключение составляли фосфатидилхолины, фосфатидилсерины и фосфатидилинозиты, образующие одну фракцию. Это же относится и к смеси ганглиозидов и протеолипидов, которые также составляют одну фракцию. Последующая хроматография во втором направлении в двух элюирующих системах: хлороформ — метанол (1:4), а затем хлороформ — метанол (2:1) и, наконец, повторная хроматография в первом направлении в системе хлороформ — метанол (2:1) позволяла разделить остальные компоненты. Разделенные зоны на хроматограмме окрашивали иодом и проводили количественную оценку с помощью химических методов. Такое определение можно проводить, не превращая фосфат в неорганический фосфор [683, 684]. Широко практикуется карбонизация липидов с последующей денситометрией [681, 685, 686], однако методы требуют стандартизации [687, 688].

Битман и др. [689] разработали метод ТСХ для анализа липидов крови, молока, яичного желтка и других тканей, приводящий к быстрому и воспроизводимому разделению, после которого можно сразу провести количественную оценку методом денситометрии. Авторы использовали двухступенчатое разделение: сначала в системе хлороформ — метанол — уксусная кислота (98:2:1) до достижения фронтом растворителя отметки 16 см, затем в системе гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (470:30:1) до прохождения растворителем 20 см. Перед карбонизацией пластинку погружали в 3%-ный раствор ацетата меди в 8%-ной фосфорной кислоте на 3 с.

Сегура и Готто [690] описали метод выделения и количественного определения органических соединений с помощью ТСХ на хроматографических пластинках, термически обработанных в присутствии бикарбоната аммония, в результате чего эти пластинки становятся флуоресцентными. Этот метод был использован для анализа липидов в микролитровых количествах плазмы [691, 692]. Недавно Сегура и Наварро [693] обнаружили, что нагревание хроматографических пластинок в присутствии SiCl_4 вызывает образование флуоресцентных производных всех классов соединений с большой воспроизводимостью и дает флуорофоры, устойчивые в течение месяцев.

Возможность классификации микроорганизмов на основе их липидного состава [694] значительно расширилась благодаря применению таких чувствительных аналитических методов, как ТСХ и ГЖХ. Анализ метанолизатов бактерий, содержащих миколевую кислоту, с помощью ТСХ позволил получить хорошие результаты анализа общего содержания миколовой кислоты в этих организмах. Минникин и др. [178] проверили возможность применения ТСХ для целей классификации бактерий, содержащих миколовые кислоты. Использование одномерной ТСХ в системе петролейный эфир — диэтиловый эфир (17:3) не дало удовлетворительных результатов, однако с помощью двумерной ТСХ удалось разделить миколаты из различных видов микобактерий. Авторы использовали элюирование смесью петролейный эфир — ацетон (19:1) в первом направлении и смесью толлуол — ацетон (99:1 до 97:3) — во втором.

Наиболее удачный метод количественного определения липидов, разделенных с помощью ТСХ, предложен Окумура с сотр. [3, 695, 696], которые использовали кварцевые стержни, на которые был нанесен силикагель. Такая система, имеющая в настоящее время коммерческое название ятроскан ТСХ/ПИД-системы, сочетает метод ТСХ с автоматическим количественным определением, который основан на принципе пламенно-ионизационного детектирования, используемого в ГЖХ.

Многие работы по разделению липидов, выполняемые с помощью обычной ТСХ, могут быть выполнены на патентованных стержневых носителях — хромародах, и в этом случае возможно детектирование всех липидов посредством пламенно-ионизационного детектора. Хромароды можно пропитать нитратом серебра или борной кислотой, чтобы улучшить разделение отдельных соединений. Разделение нейтральных липидов и глицерофосфолипидов по степени ненасыщенности позволяет получить более подробную информацию о составе липидов первичного экстракта.

Количество наносимого образца для такого анализа составляет 2—20 мкг в 1—2 мкл раствора. Нейтральные липиды мож-

но разделять в следующих системах: петролейный эфир — диэтиловый эфир — муравьиная кислота (97:3:1) [697, 698]; 1,2-дихлорэтан — хлороформ — уксусная кислота (920:80:1) [699]; легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир (17:3) [700, 701]; легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир — муравьиная кислота (850:150:1) [699]; кроме того, можно проводить многократное элюирование смесью гексан — уксусная кислота (100:1), а затем смесью гексан — уксусная кислота — пропанол-2 (200:2:1) [702] или смесью легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (175:25:2) [703]. При хроматографии в этих системах фосфолипиды остаются на старте. В работах [704, 705] нейтральные липиды отделяли от фосфолипидов в смеси легкий петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (90:10:1). В работе [706] подвергали разделению липиды 30 видов дрожжей; нейтральные липиды, включая гликолипиды из микроорганизмов, разделяли в смеси хлороформ — метанол — вода (40:10:1).

Определение отношения фосфатидилхолина (лецитина) к сфингомиелину (Л/С) позволяет получать информацию о развитии плода во время беременности и с большой степенью надежности судить о завершении развития легких. Так, Глюик и сотр. [707] разделяли фосфолипиды в системе хлороформ — метанол — вода (65:25:4) и карбонизировали вещества разделившихся зон серной кислотой. Сейчас существуют модификации первоначальной методики, касающиеся в том числе и определения отношения Л/С [708, 709]. Используется также хроматография на хроматодах [710].

В недавно опубликованном обзоре Акмана [4] рассмотрены возможности ятроскан-системы и ее применение для анализа липидов в клинике и исследовательской работе.

4.5.2. Газо-жидкостная хроматография

Высокотемпературная ГЖХ — хороший метод качественной и количественной оценки общего состава липидов первичного экстракта. Часто обычные природные свободные жирные кислоты и их моно-, ди- и триэфиры с глицерином сильно отличаются по молекулярной массе между собой, а также от свободного холестерина и его эфиров с жирными кислотами. Поэтому на основании различий в молекулярной массе можно получить, за немногими исключениями, эффективное разделение нейтральных липидов, в том числе полученных после триметилсилилирования свободных окси- и карбоксигрупп [566, 711]. Большинство первичных экстрактов липидов из природных источников обогащены ионными липидами, такими, как глицерофосфатиды, сфинголипиды и гликолипиды, которые подвергают ГЖХ лишь

после предварительного отщепления остатков фосфорной и сиаловой кислот. Это можно сделать с помощью ферментативных [566] или химических [711, 712] методов, однако не всегда строго адекватно.

Хотя стандартные методики ГЖХ применимы к большинству природных смесей липидов, наибольший прогресс в этой области достигнут в случае анализа липидов первичного экстракта плазмы [713—718] и отдельных классов липопротеинов [714, 719]. Это объясняется удачным распределением компонентов смеси по их молекулярным массам и их относительным содержанием в смеси. Наиболее успешное разделение липидов первичного экстракта методом ГЖХ было получено на коротких неполярных колонках с силоксаном, первоначально использовавшихся для разделения природных триацилглицеринов [551]. Довольно удобными для такого рода разделений оказались колонки из нержавеющей стали или стеклянные (от 30 до 50 см длиной и внутренним диаметром от 0,2 до 0,3 мм), заполненные 1—3% метилсилоксана или эквивалентными силиконовыми полимерами для высокотемпературной ГЖХ, нанесенными на внутренний инертный носитель. Колонки предварительно выдерживали в течение 2—3 ч при температуре 350°C и проверяли их на способность необратимо сорбировать вещества. В зависимости от состава липидов использовали линейный градиент температуры в пределах 175—350°C (со скоростью нарастания температуры 4—8°C/мин). Метод ГЖХ также широко применяется при анализе смесей нейтральных липидов плазмы [721—723].

В последнее время для ГЖХ липидов стали применять капиллярные колонки [554, 556]. Наилучшее разделение с практически количественным выходом было получено с помощью ГЖХ на капиллярных колонках длиной 5 м при использовании в качестве газа-носителя водорода. В этих условиях было получено полное разделение глицеролипидов на индивидуальные соединения, отличающиеся на одно метиленовое звено, а также их некоторых насыщенных и ненасыщенных гомологов. Следует отметить, что при ГЖХ на колонках длиной 15 м наблюдается заметное расщепление триацилглицеринов с длинными цепями [724] и эфиров холестерина [725].

4.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Система с обращенной фазой для жидко-жидкостного хроматографического разделения липидов первичного экстракта была описана Хиршем [726] в 1963 г. Позднее была разработана методика с сефадексом, казавшаяся перспективной [599, 648]. Несмотря на большие успехи, достигнутые в этой области в некоторых лабораториях [601, 602], не удалось преодолеть экспери-

ментальные трудности при применении этих методов, а также длительность анализа и плохую воспроизводимость.

Системы адсорбционной ВЭЖХ и обращенно-фазовой ВЭЖХ в настоящее время кажутся идеальными для целей анализа общего состава липидов первичных экстрактов из большинства источников. Однако до сих пор в этой области сделано немного. Дункан и др. [727] описали разделение смесей свободного холестерина и различных эфиров холестерина с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с использованием в качестве подвижной фазы смеси пропанол-2 — ацетонитрил (11:1 или 5:2). Пользуясь тем же методом, Смит и др. [728] получили характерные картины состава нейтральных липидов плазмы здоровых крыс и крыс, больных диабетом. В результате хроматографии первичных экстрактов липидов из тканей крыс каждого типа были получены и охарактеризованы 13 фракций, включая различные подфракции триацилглицеринов и эфиров холестерина. Фосфолипиды плазмы, по-видимому, элюировались намного раньше основных липидов, в результате чего не были количественно определены. Для ВЭЖХ использовали колонку с зорбаксом OD (2,5 см × 4,5 мм, диаметр частиц 5 мкм, Du Pont) и УФ-детектор, измеряющий поглощение при 215 нм. Элюирование проводили смесью пропанол-2 — ацетонитрил (5:2) при скорости подачи элюента 1 мл/мин (относительное стандартное отклонение составляло 4—8% в зависимости от количества растворенного вещества и размеров пика).

Чоупек и Мареч [729] сравнили результаты разделения одного и того же образца нейтральных липидов методами ВЭЖХ и ГЖХ. Для разделения эфиров холестерина и жирных кислот с длиной цепи 14—20 атомов углерода использовали колонку с обращенной фазой (сепарон SI VSIL, ЧССР). Поскольку эфиры липидов слабо поглощают в УФ-области, лишь немногие системы растворителей можно использовать в этом случае. Область применения рефрактометра также ограничена. Поэтому были предприняты многочисленные попытки разработки других детекторов.

Эрдал и др. [730] предложили использовать для разделения первичных экстрактов липидов систему ВЭЖХ в сочетании с масс-спектроскопией для идентификации и количественной оценки пиков с последующей обработкой данных с помощью компьютера. Промежуточная система для соединения ВЭЖХ с масс-спектрометром основана на принципе бесконечной цепи, в которой в качестве транспортного устройства используется петля специальной конструкции. После удаления растворителя образец транспортируется с помощью петли в реактор, где образец упаривается (если он содержит летучие вещества) или превращается в углеводороды (в случае нелетучих соедине-

ний) и вводится в масс-спектрометр с помощью газа-носителя. Эта система была проверена на модельных соединениях, имеющих сходные с липидами свойства, и оказалась достаточно полезной.

Комптон и Парди [731] предложили использовать систему ВЭЖХ в сочетании с универсальным детектором глицеролипидов, в основе которого лежит колориметрическое определение формальдегида (для определения последнего авторы создали чувствительный реактив).

4.6. Выводы

Обзор работ последних лет по хроматографическим методам анализа липидов показывает, какой большой прогресс достигнут в этой области, несмотря на ограниченные успехи в методологии. Заметно увеличилось разнообразие образцов, анализируемых с привлечением различных хроматографических методов. В то же время не произошло значительных изменений в технике хроматографического анализа. Основным достижением ГЖХ было введение стеклянных капиллярных и особенно гибких кварцевых колонок, которые сделали систему более пригодной для долговременной рутинной работы.

Наибольшим достижением являются развитие и применение методов ВЭЖХ для анализа липидов, однако осталась нерешенной задача создания универсального чувствительного детектора. Наибольшее развитие в связи с разработкой систем ВЭЖХ получили методы хроматографии малолетучих и термически неустойчивых полярных и высокомолекулярных соединений. Однако успехи в разработке системы ВЭЖХ следует рассматривать скорее как дополняющие, а не конкурирующие с системами ГЖХ. Так, в тех случаях, когда были применены оба метода, анализ с помощью ГЖХ был более быстрым по сравнению с ВЭЖХ. Это объясняется различием в свойствах подвижных фаз, и поэтому нет оснований считать, что такая быстрота анализа сможет быть достигнута в методе ВЭЖХ. Более того, метод ГЖХ имеет преимущество и в высокочувствительном детектировании липидов с помощью водородного пламенно-ионизационного детектора. Однако для анализа ГЖХ остается нерешенной проблема получения летучих производных полярных и термически неустойчивых или имеющих высокую температуру кипения липидов.

Успехи в области ВЭТСХ менее значительны, хотя можно привести примеры успешного разделения с помощью этого метода некоторых трудно разделяемых смесей.

Однако, несмотря на указанные достижения, в настоящее время ни один отдельно взятый хроматографический метод не

может быть универсальным для аналитического или препаративного разделения липидов. Поэтому необходимо разрабатывать в ближайшем будущем аналитические системы, включающие несколько взаимно дополняющих друг друга методов. Это, по-видимому, будут системы, объединяющие ГЖХ или ВЭЖХ с масс-спектрометрией, поскольку каждый из указанных хроматографических методов в отдельности не в состоянии справиться с задачей идентификации и количественной оценки при анализе сложных смесей липидов.

Введение в практику автоматизированных систем хроматографического анализа, включая обработку полученных данных с помощью компьютера, привело к значительной экономии времени и увеличению точности обработки данных. Таким образом, главными стадиями хроматографического анализа, наиболее сильно различающимися у разных авторов, в настоящее время остаются методы приготовления и хранения образца.

Литература

1. *Renkonen O., Luukkonen A.* — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. 2nd Edn. Vol. 1. New York: Marcel Dekker, 1976, p. 1.
2. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Пер. с англ./Под ред. А. Златкиса, Р. Кайзера. — М.: Мир, 1979.
3. *Okumura T. J. Chromatogr.*, **184**, 37 (1980).
4. *Ackman R. G. Methods Enzymol.*, **72**, 205 (1981).
5. *Cochrane G. C. J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 440 (1975).
6. *Kuksis A.* — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. 2nd Edn. Vol. 1./Ed. Marineti G. V. New York: Marcel Dekker, 1976, p. 215.
7. *Kuksis A. Separ. Purif. Methods.*, **6**, 353 (1977).
8. *Hubbard W. C., Watson J. T., Sweetman B. J.* — In: *Biological Applications of Liquid Chromatography*. Vol. 10./Ed. Hawk G. New York: Marcel Dekker, 1979, p. 31.
9. *Aitzetmüller K. Lipids*, **17** (1982).
10. *Pryde A., Gilbert M. T. Applications of High Performance Liquid Chromatography*. London: Chapman and Hall, 1979.
11. *Touchstone J. C., Sherma J.* (Editors). *Densitometry in Thin-Layer Chromatography, Practice and Applications*. Somerset, NJ: Wiley, 1979.
12. *Whitting L. A.* (Editor). *Glycolipid Methodology*. Champaign, IL: Amer. Oil Chem. Soc., 1976.
13. *Bergelson L. D.* (Editor), *Lipid Biochemical Preparations*. Amsterdam: Elsevier, 1980.
14. *Kuksis A. J. Chromatogr.*, **143**, 3 (1977).
15. *Kuksis A.* — In: *Fatty Acids and Glycerides*. Vol. 1./Ed. Kuksis A. New York: Plenum, 1978, p. 1.
16. *Myher J. J.* — In: *Fatty Acids and Glycerides*. Vol. 1./Ed. Kuksis A. New York: Plenum, 1978, p. 123.
17. *Lie Ken Jie M. S. F. Advan. Chromatogr.*, **18**, 1 (1980).
18. *Dallas M. S. J., Morris L. J., Nichols B. W.* — In: *Chromatography*. 3rd Edn./Ed. Heftmann E. New York: Van Nostrand-Reinhold, 1975, p. 527.
19. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
20. *Nelson G. J.* — In: *Analysis of Lipids and Lipoproteins*/Ed. Perkins E. G. Champaign, IL: Amer. Oil Chem. Soc., 1975, p. 1.
21. *Shaikh N. H., Downar E. Circ. Res.*, **49**, 316 (1981).

22. *Mogelson S., Wilson G. E., Jr., Sobel B. E.* Biochim. Biophys. Acta, **619**, 680 (1980).
23. *Bligh E. G., Dyer W. J.* Can. J. Biochem., **37**, 911 (1959).
24. *Zahler P., Niggli V.* — In: Methods of Membrane Biology. Vol. 8./Ed. Korn E. D. New York: Plenum, 1977, p. 1.
25. *Scott C. C., Ackerman C. A., Snyder F.* Biochim. Biophys. Acta, **575**, 215 (1979).
26. *Arthur G., Sheltawy A.* Biochem. J., **191**, 523 (1980).
27. *Spanner S.* — In: Form and Function of Phospholipids. Biochim. Biophys. Acta Library, Vol. 3./Eds. Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C. Amsterdam: Elsevier, 1973, p. 43.
28. *Hanson B. A., Lester R. L. J.* Lipid Res., **21**, 309 (1980).
29. *Taylor L., Polgar P., McAteer J. A., Douglas W. H. J.* Biochim. Biophys. Acta, **572**, 502 (1979).
30. *Struijk C. B., Berthuis R. K., Pabon H. J., van Dorp D. A.* Res. Trav. Chim. Pays-Bas, **85**, 2 (1966).
31. *Min B. H., Pao J., Garland W. A., de Silva J. A. F., Parsonnet M. J.* Chromatogr., **183**, 411 (1980).
32. *Pace-Asciak C., Morawska K., Wolfe L. S.* Biochim. Biophys. Acta, **218**, 288 (1970).
33. *Wells M. A., Dittmer J. C.* Biochemistry, **2**, 1259 (1963).
34. *Nelson G. J.* — In: Blood Lipids and Lipoproteins./Ed. Nelson G. J. New York: Wiley-Interscience, 1972, p. 25.
35. *Randell J. A. J., Pennock C. A. J.* Chromatogr., **195**, 257 (1980).
36. *Phillips F., Privett O. S.* Lipids, **14**, 590 (1979).
37. *Kates M., Eberhardt F. M.* Can. J. Bot., **35**, 895 (1957).
38. *Yang S. F., Faure S., Benson A. A. J.* Biol. Chem., **242**, 477 (1967).
39. *Roughan P. G., Slack C. R., Holland R.* Lipids, **13**, 497 (1978).
40. *Phillips F. C., Privett O. S.* Lipids, **14**, 949 (1979).
41. *Fairbairn D. J.* Biol. Chem., **157**, 645 (1945).
42. *Kates M.* — In: Laboratory, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 3. Techniques of Lipidology./Eds. Work T. S., Work E. Amsterdam: North-Holland, 1972, p. 347.
43. *Rouser G., Nelson G. J., Fleischer S., Simon G.* — In: Biological Membranes./Ed. Chapman D. New York: Academic Press, 1968, p. 5.
44. *Kramer J. K. G., Hulan H. W. J.* Lipid Res., **19**, 103 (1978).
45. *Christie W. W.* Lipid Analysis. Oxford: Pergamon, 1973.
46. *Pitas R. E., Nelson G. J., Jaffe E. M., Mahley R. W.* Lipids, **14**, 469 (1979).
47. *Pitas R. E., Hagerty M. M., Jensen R. G.* Lipids, **13**, 844 (1978).
48. *Williams J. P.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 461 (1980).
49. *Robert J., Mandel P., Rebel G.* Lipids, **14**, 852 (1979).
50. *Arvidson G. A. E. J.* Lipid Res., **8**, 155 (1967).
51. *Smith M. W., Callan Y., Kahng M. W., Tramp B. F.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 192 (1980).
52. *Koizumi K., Kano-Tanaka K., Shimizu S., Nishida K., Yamanaka N., Ota K.* Biochim. Biophys. Acta, **619**, 344 (1980).
53. *Roehm J. N., Privett O. S.* Lipids, **5**, 353 (1970).
54. *Emken E. A., Rohwedder W. K., Dutton H. J., Dejarlais W. J., Adlof R. O., McKin J. F., Daugherty R. M., Iacono J. M.* Lipids, **14**, 547 (1979).
55. *Dodge J. T., Phillips G. B. J.* Lipid. Res., **7**, 387 (1966).
56. *Borgström B.* Acta Physiol. Scand., **25**, 101 (1952).
57. *Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **40**, 425 (1963).
58. *Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A.* — In: Lipid Chromatographic Analysis. 2nd. Edn. Vol. 3./Ed. Marinetti G. V. New York: Marcel Dekker, 1976, p. 713.

59. Gellerman J. L., Anderson W. H., Richardson D. G., Schlenk H. *Biochim. Biophys. Acta*, **388**, 277 (1975).
60. Wilson A. C., Kates M., de la Roche A. I. *Lipids*, **13**, 504 (1978).
61. Fujino Y., Miyazawa T. *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 442 (1979).
62. Meyer H., Provasoli L., Meyer I. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 464 (1979).
63. Yang L. L., Haug A. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 308 (1979).
64. Smith P. F., Patel K. R., Al-Shammaki A. J. N. *Biochim. Biophys. Acta*, **617**, 419 (1980).
65. Das S. K., Steen M. E., McCullough M. S., Bhattacharya D. K. *Lipids*, **13**, 679 (1978).
66. Marion J., Wolfe L. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 25 (1979).
67. Ogino H., Matsumara T., Satouchi K., Saito K. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 57 (1979).
68. Dwyer B. E., Bersohn J. *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 309 (1979).
69. Karney R. I., Dhopeshwarkar G. A. *Lipids*, **14**, 257 (1979).
70. Wood R., Chandler F., Matocha M., Zoeller A. *Lipids*, **14**, 789 (1979).
71. Selivonchick D. P., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O. *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 242 (1980).
72. Vance D. E., Sweeley C. C. *J. Lipid Res.*, **8**, 621 (1967).
73. Jigami Y., Suzuki O., Nakasato S. *Lipids*, **14**, 937 (1979).
74. Burns C. P., Luttenegger D. G., Wei S.-P. L., Spitzer A. A. *Lipids*, **12**, 747 (1977).
75. Im W. B., Deutchler J. T., Spector A. A. *Lipids*, **14**, 1003 (1979).
76. Rooney S. A., Canavan P. M., Motoyama E. K. *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 56 (1974).
77. Nardone L. L., Andrews S. B. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 276 (1979).
78. Rabinowitz J. I., Askins S. E., Luddy F. E. *Lipids*, **13**, 317 (1978).
79. Johnson R. G., Lugg M. A., Nicholas T. E. *Lipids*, **14**, 555 (1979).
80. Haas M. A., Longmore W. J. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 166 (1979).
81. Okano G., Matsuzaka H., Shimojo T. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 167 (1980).
82. Buchler K. F., Rhodes R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 186 (1980).
83. Oram J. F., Shafir E., Bierman E. L. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 214 (1980).
84. Wood R., Snyder F. *Lipids*, **3**, 129 (1968).
85. Lee T.-C., Stephens V. F. N., Snyder F. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 420 (1980).
86. Karli J. N., Lewis G. M. *Lipids*, **9**, 819 (1974).
87. McKibbin J. M. *J. Lipid Res.*, **19**, 131 (1978).
88. Patton G. M., Fasulo J. M., Robins S. J. J. *J. Lipid Res.*, **23**, 190 (1982).
89. Smith M., Jungalwala F. B., *J. Lipid Res.*, **22**, 697 (1981).
90. Geurts van Kessel W. S. M. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **57** (1980), No. 2, Abstr. No. 84.
91. Kuksis A. — In: *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*. Vol. 12/Ed. Holman R. T. Oxford: Pergamon, 1972, p. 1.
92. Wagner H., Hörhammer L., Wolff P. *Biochem. Z.*, **334**, 175 (1961).
93. Kuksis A., Breckenridge W. C., Marai L., Stachnyk O. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 537 (1968).
94. Skipski V. P., Barclay M. *Methods Enzymol.*, **14**, 530 (1969).
95. Beckman J. K., Coniglio J. G. *Lipids*, **14**, 262 (1979).
96. Breckenridge W. C., Kuksis A. *J. Lipid Res.*, **8**, 473 (1967).
97. Vitiello F., Zanetta J.-P. *J. Chromatogr.*, **166**, 637 (1978).
98. Fischer W., Laine R. A., Nankano M. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 298 (1978).
99. Fischer W., Schuster D., Laine R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 389 (1979).

100. *Carroll K. K.* — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. 2nd Ed. Vol. 1/Ed. *Marinetti G. V.* New York: Marcel Dekker, 1976, p. 173.
101. *Withers N. W., Nevenzel J. C.* *Lipids*, 12, 989 (1977).
102. *Nicolaides N. J.* *Chromatogr. Sci.*, 8, 717 (1970).
103. *Nicolaides N., Fu H. C., Ansari M. N. A., Rice G.* *Lipids*, 7, 506 (1972).
104. *Serdarevich B. J.* *Amer. Oil Chem. Soc.*, 44, 381 (1967).
105. *Ruggieri S., Fallani A.* *Lipids*, 14, 323 (1979).
106. *Friedman G., Stein O., Stein Y.* *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 521 (1979).
107. *Lok C. M., Folkersma B.* *Lipids*, 14, 872 (1979).
108. *van Dessel G., Lagrou A., Hilderson H. J., Dommissse R., Esmans E., Dierick E.* *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 296 (1979).
109. *Hirsch J., Ahrens E. H., Jr.* *Biol. Chem.*, 233, 311 (1958).
110. *Blank M. L., Privett O. S.* *J. Dairy Sci.*, 47, 481 (1964).
111. *Shehata A. A. Y., de Man J. M., Alexander J. C.* *Can. Inst. Food Technol. J.*, 4, 61 (1971).
112. *Taylor M. W., Hawke J. C.* *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 10, 40 (1975).
113. *Morrison M., Hawke J. C.* *Lipids*, 12, 994 (1977).
114. *Lintas C., Balduzzi A. M., Bernardini M. P., Di Muccio A.* *Lipids*, 14, 298 (1979).
115. *Klein P. D., Janssen E. T.* *J. Biol. Chem.*, 234, 1417 (1959).
116. *Serdarevich B., Carroll K. K.* *J. Lipid Res.*, 7, 277 (1966).
117. *Frankel E. N., Neff W. E.* *Lipids*, 14, 39 (1979).
118. *Rigaud M., Durand J., Breton J. C.* *Biochim. Biophys. Acta*, 573, 408 (1979).
119. *Sessa D. J., Gardner H. W., Kleiman R., Weisleder D.* *Lipids*, 12, 613 (1977).
120. *Grosch W., Laskawy G.* *Biochim. Biophys. Acta*, 575, 439 (1979).
121. *Espelle K. E., Kolattukudy P. E.* *Lipids*, 13, 832 (1978).
122. *Daniels E. G.* — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. 2nd Ed. Vol. 2/Ed. *Marinetti G. V.* New York: Marcel Dekker, 1976, p. 611.
123. *Bansbach M. W., Love P. K.* *Prostaglandins*, 17, 193 (1977).
124. *Bergström S., Samuelsson B.* *Acta Chem. Scand.*, 17, 5282 (1963).
125. *Pike J. E., Lincoln F. H., Schneider W. P.* *J. Org. Chem.*, 34, 3553 (1969).
126. *Samuelsson B.* *J. Biol. Chem.*, 238, 3229 (1963).
127. *Anggard E.* *Biochem. Pharmacol.*, 14, 1507 (1965).
128. *Chanderbhan R., Hodges V. A., Treadwell C. R., Vahouny G. V.* *J. Lipid Res.*, 20, 116 (1979).
129. *Daniels E. G., Pike J. E.* — In: *Prostaglandin Symp. Worcester Found Exptl. Biol.*/Eds. *Ramwell P. W., Shau J. E.* New York: Wiley-Interscience, 1968, p. 379.
130. *Wallach D. P., Daniels E. G.* *Biochim. Biophys. Acta*, 231, 445 (1971).
131. *Hamberg M., Samuelsson B.* *J. Biol. Chem.*, 241, 257 (1966).
132. *Green K.* *Biochim. Biophys. Acta*, 231, 419 (1971).
133. *Kindahl H., Granstrom E.* *Biochim. Biophys. Acta*, 280, 466 (1972).
134. *Svanborg K., Bygdeman M.* *Eur. J. Biochem.*, 28, 127 (1972).
135. *Powell W. S.* *Biochim. Biophys. Acta*, 575, 335 (1979).
136. *Fioriti J. F., Buide N., Sims R. J.* *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 46, 108 (1969).
137. *Evans C. D., McConnell D. G., Hoffman R. L., Peters H. J.* *Amer. Chem. Soc.*, 44, 281 (1967).
138. *Pokorny J., Hlakid J., Zeman I.* *Pharmazie*, 23, 332 (1968).
139. *Kleiman R., Spencer G. F., Earle F. R., Nieschlag H. J., Barclay A. S.* *Lipids*, 7, 660 (1972).
140. *Kasama K., Uezumi N., Itoh K.* *Biochim. Biophys. Acta*, 202, 56 (1970).
141. *Ferreti A., Flanagan V. P.* *Lipids*, 12, 198 (1977).
142. *Haathi E., Nikkari T.* *Acta Chem. Scand.*, 17, 2565 (1963).
143. *Erdahl W. L., Privett O. S.* *Lipids*, 12, 797 (1977).

144. Mangold H. K., Malins D. C. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **37**, 383 (1960).
145. Vogel W. C., Doizaki W. M., Zieve L. J. *Lipid Res.*, **3**, 138 (1962).
146. Sharaf D. M., Clark S. J., Downing D. T. *Lipids*, **12**, 786 (1977).
147. van der Vusse G. J., Roemen T. H. M., Reneman R. S. *Biochim. Biophys. Acta*, **617**, 347 (1980).
148. Privett O. S., Blank M. L., Codding D. W., Nickell E. C. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 381 (1965).
149. MacDonald G., Baker R. R., Thompson W. J. *Neurochem.*, **24**, 655 (1975).
150. Pernes J.-F., Nurit Y., De Heaulme M. J. *Chromatogr.*, **181**, 254 (1980).
151. Mancha M., Stokes G. B., Stumpf P. K. *Anal. Biochem.*, **68**, 600 (1976).
152. Oo K. C., Stumpf P. K. *Lipids*, **14**, 132 (1979).
153. Thomas A. E., Sharoun J. E., Ralston H. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 789 (1965).
154. Ammon H. V., Thomas P. J., Phillipis S. F. *Lipids*, **14**, 395 (1979).
155. Renkonen O. *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 114 (1968).
156. Lamb R. G., Gardner T. G., Fallon H. J. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 385 (1980).
157. Pollack J. D., Clark D. S., Somerson N. L. J. *Lipid Res.*, **12**, 563 (1971).
158. Privett O. S., Nutter L. J., Gross R. A. — In: *Symposium: Dairy Lipids and Lipid Metabolism*,/Ed. Brink M. F., Kritchevsky D. Westport, CT: Avi, 1968, p. 99.
159. Breckenridge W. C., Kuksis A. J. *Lipid Res.*, **9**, 388 (1968).
160. Kuksis A., Marai L., Myher J. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **50**, 193 (1973).
161. Marshall M. O., Knudsen J. *Eur. J. Biochem.*, **81**, 259 (1977).
162. Oehlenschlaenger J., Gercken G. *Lipids*, **13**, 557 (1978).
163. Snyder F. J. *Chromatogr.*, **82**, 7 (1973).
164. Renkonen O. — In: *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*. Vol. 2./Eds. Niederwieser A., Pataki G. Ann. Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1971, p. 143.
165. Sugiura T., Masuzawa Y., Waku K. *Lipids*, **15**, 475 (1980).
166. Lin H. J., Lie Ken Jui M. S. F., Lie C. L. H., Lee D. H. S. *Lipids*, **12**, 620 (1977).
167. Myher J. J., Kuksis A. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **79** (1982).
168. Wood R., Snyder F. *Lipids*, **2**, 89 (1967).
169. Kuntz F. *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 331 (1973).
170. Vioque E., Holman R. T. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 63 (1962).
171. Morris L. J., Wharry D. M., Hammond E. W. J. *Chromatogr.*, **33**, 471 (1968).
172. Jordan B. R., Harwood J. L. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 218 (1979).
173. Morris L. J., Wharry D. M. J. *Chromatogr.*, **20**, 27 (1965).
174. Matsuda Y., Beppu T., Arima K. *Biochim. Biophys. Acta*, **530**, 439 (1978).
175. Morris L. J. J. *Chromatogr.*, **12**, 321 (1963).
176. Christiansen E. N., Thomassen M. S., Christiansen R. Z., Osmundsen H., Norum K. R. *Lipids*, **14**, 829 (1979).
177. Litchfield C., Tyszkiewicz J., Marcantonio E. E., Noto G. *Lipids*, **14**, 619 (1979).
178. Minnikin D. E., Hutchinson I. G., Caldicott A. B., Goodfellow M. J. *Chromatogr.*, **188**, 221 (1980).
179. Green K., Samuelsson B. J. *Lipid Res.*, **5**, 117 (1964).
180. Anderson N. H. J. *Lipid Res.*, **10**, 316 (1969).
181. Crawshaw K. *Prostaglandins*, **3**, 607 (1973).
182. Chanderbhen R., Hodges V. A., Treadwell C. R., Vahouny G. V. J. *Lipids Res.*, **20**, 116 (1979).
183. Wickramasinghe J. A. F., Shaw S. R. *Prostaglandins*, **4**, 903 (1973).
184. Berthuis R. K., Nugteren D. H., Pabon H. J. J., van Dorp D. A. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **87**, 461 (1968).

185. Murota S. I., Mitsui Y., Kawamura M. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 351 (1979).
186. Graff G., Stephenson J. H., Winget R. R., Goldberg N. D. *Lipids*, **14**, 212 (1979).
187. Graff G., Stephenson J. H., Glass D. B., Haddox M. K., Goldberg N. D. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7662 (1978).
188. M. W. Anderson, Crutchley D. J., Chaudhari A., Wilson A. G. E., Eling T. E. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 40 (1979).
189. Pace-Asciak C. R., Carrara M. C. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 177 (1979).
190. Pace-Asciak C. R., Rosenthal A., Domazet Z. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 182 (1979).
191. Graff G., Dunham E. W., Krick T. P., Goldberg N. D. *Lipids*, **14**, 334 (1979).
192. Light R. J., Samuelsson B. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 232 (1972).
193. Lapetina E. G., Cuatrecasas P. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 394 (1979).
194. Vick B. A., Zimmerman D. C., Weisleder D. *Lipids*, **14**, 734 (1979).
195. Hamberg M., Svensson J., Waka Bayashi T., Samuelsson B. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 345 (1974).
196. Hamilton J. G., Tobias L. D. *Prostaglandins*, **13**, 1019 (1977).
197. Nugteren D. H., Hazelhof E. *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 448 (1973).
198. Herrmann H., Gereken G. *Lipids*, **15**, 179 (1980).
199. Litchfield C. *Analysis of Triglycerides*. New York: Academic Press, 1972.
200. Mikolajczak K. L., Smith C. R., Jr. *Lipids*, **2**, 261 (1967).
201. Smith C. R., Jr., Madrigal R. V., Plattner R. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 314 (1979).
202. Yazicioglu T., Karaali A., Gokcen J. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **55**, 412 (1978).
203. Muramatsu T., Schmid H. H. O. *Chem. Phys. Lipids*, **9**, 123 (1972).
204. Kasama K., Rainey W. T., Snyder F. *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 648 (1973).
205. Morris L. J., Hall S. W. *Lipids*, **1**, 188 (1966).
206. Payne-Wahl K., Plattner R. D., Spencer G. F., Kleiman R. *Lipids*, **14**, 601 (1979).
207. Kleiman R., Smith C. R., Yates S. G. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 169 (1965).
208. Oette K., Tschung T. S. Z. *Physiol. Chem.*, **361**, 1179 (1980).
209. Fears R., Beggaley K. H., Alexander R., Morgan B., Hindley R. M. *J. Lipid Res.*, **19**, 3 (1978).
210. Hancock A. J., Greenwald S. M., Sable H. Z. *J. Lipid Res.*, **16**, 300 (1975).
211. Rouser G., O'Brien J., Heller D. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 14 (1961).
212. Demopoulos C. A., Pinckard R. N., Hanahan D. J. *J. Biol. Chem.*, **254**, 935 (1979).
213. Crawford C. G., Wells M. A. *Lipids*, **14**, 757 (1979).
214. Horigane A., Horiguchi M., Matsumoto T. *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 385 (1979).
215. Merkel G. J., Perry J. J. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 68 (1980).
216. Kalin J. A., Allen C. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 76 (1980).
217. Do U. H., Ramachandran S. J. *Lipid Res.*, **21**, 888 (1980).
218. Chakrabarti P., Khorana H. G. *Biochemistry*, **14**, 5021 (1975).
219. Stoffel W., Michaelis G. Z. *Physiol. Chem.*, **357**, 21 (1976).
220. Stuhne-Sekalec L., Stanacev N. Z., Marai L., Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **57**, 408 (1979).
221. Pugh E. L., Kates M., Hanahan D. J. *J. Lipid Res.*, **18**, 710 (1977).
222. Holub B. J., Kuksis A., Thompson W. J. *Lipid Res.*, **11**, 558 (1970).
223. Luthra M. G., Sheltawy A. *Biochem. J.*, **126**, 251 (1972).

224. Okano G., Kawamoto T., Akino T. Biochim. Biophys. Acta, 528, 385 (1978).
225. Okano G., Akino T. Lipids, 14, 541 (1979).
226. Kawamoto T., Okano G., Akino T. Biochim. Biophys. Acta, 619, 20 (1980).
227. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 74, 4315 (1977).
228. Schacht J. J. Lipid Res., 19, 1063 (1978).
229. Jungalwala F. B., Turel R. J., Evans J. E., McCluer R. H. Biochem. J., 145, 517 (1975).
230. Jungalwala F. B., Evans J. E., McCluer R. H. Biochem. J., 155, 55 (1976).
231. Kiuchi K., Ohta T., Ebine H. J. Chromatogr., 133, 226 (1977).
232. Rainey M. L., Purdy W. C. Anal. Chim. Acta, 93, 211 (1977).
233. Deming S., Morgan S. L. Anal. Chem., 45, 278A (1973).
234. Geurts van Kessel W. S. M., Hax W. M. A., Demel R. A., de Gier J. Biochim. Biophys. Acta, 486, 524 (1977).
235. Aboud L. G., Salem N., MacNeill M., Butler M. Biochim. Biophys. Acta, 530, 35 (1978).
236. Blom C. P., Deirkauf F. A., Riemersma J. C. J. Chromatogr., 171, 331 (1979).
237. Gross R. W., Sobel B. E. J. Chromatogr., 197, 79 (1980).
238. Hurset W. J., Martin R. A., Jr. J. Amer. Oil Chem. Soc., 57, 307 (1980).
239. Skipski V. P., Peterson R. F., Barclay M. Biochem. J., 90, 374 (1964).
240. Sen P. C., Ray T. K. Biochim. Biophys. Acta, 618, 300 (1980).
241. Christiansen R. Z., Norseth J., Christiansen E. N. Lipids, 14, 614 (1979).
242. Holub B. J., McNaughton J. A., Pikarski J. Biochim. Biophys. Acta, 572, 413 (1979).
243. O'Kelly J. C., Mills S. C. Lipids, 14, 983 (1979).
244. Fischer S. K., Rowe C. R. Biochim. Biophys. Acta, 618, 231 (1980).
245. Parker C. L., Waite M., King L. Biochim. Biophys. Acta, 620, 142 (1980).
246. Taylor L., Polgar P., McAteer J. A., Douglas W. H. J. Biochim. Biophys. Acta, 572, 502 (1979).
247. Rooney S. R., Wai-Lee T. S., Gobran L., Motoyama E. K. Biochim. Biophys. Acta, 431, 447 (1976).
248. Rooney S. R., Gobran L. I., Marino P. A., Maniscalco W. M., Gross I. Biochim. Biophys. Acta, 572, 64 (1979).
249. Gross I., Wilson C. M., Ingleson L. D., Brehier A., Rooney S. R. Biochim. Biophys. Acta, 575, 375 (1979).
250. Roiney S. A., Nardone L. L., Shapiro D. L., Motoyama E. K., Gobran L., Zaehring N. Lipids, 12, 438 (1977).
251. Galla H. J., Hartmann W. Chem. Phys. Lipids, 27, 199 (1980).
252. Burns C. P., Wei S. P. L., Luttenegger D. G., Spence A. A. Lipids, 14, 144 (1979).
253. Rouser G., Kritchevsky C., Yamamoto A., Simon G., Galli C., Bauman A. J. Methods Enzymol., 14, 272 (1969).
254. Jamdar S. C. Lipids, 14, 463 (1979).
255. Holub B. J. Biochim. Biophys. Acta, 618, 255 (1980).
256. Shaikh N. H., Palmer F. B. St. C. J. Neurochem., 28, 395 (1977).
257. Daniels C. J., Palmer F. B. St. C. Biochim. Biophys. Acta, 618, 263 (1980).
258. Bleasdale J. E., Wallis P., MacDonald P. C., Johnston J. M. Biochim. Biophys. Acta, 575, 135 (1979).
259. Kawamoto T., Akino T., Nakamura M., Mori B. Biochim. Biophys. Acta, 619, 35 (1980).
260. Chenery R. J., McLean A. E. M. Biochim. Biophys. Acta, 572, 9 (1979).
261. Nishihara M., Kito M. Biochim. Biophys. Acta, 531, 25 (1978).
262. Body D. R., Gray G. M. Chem. Phys. Lipids, 1, 254 (1967).

263. *Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. H. O.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 420 (1980).
264. *Leikin A. I., Nervi A. M., Brenner R. R.* Lipids, **14**, 102 (1979).
265. *Lecerf J.* Biochim. Biophys. Acta, **617**, 398 (1980).
266. *Suyama K., Adachi S., Sugawara H., Honjon H.* Lipids, **14**, 707 (1979).
267. *Blakeer W. D., Moscatelli E. A.* Lipids, **14**, 1027 (1979).
268. *Brunetti M., Gatti A., Porcellati G.* Lipids, **14**, 925 (1979).
269. *Cox J. W., Snyder W. R., Horrocks L. A.* Chem. Phys. Lipids, **25**, 369 (1979).
270. *Peter H. W., Wolf H. U.* J. Chromatogr., **82**, 15 (1973).
271. *Eisele T. A., Parker R. S., Yoss T. K., Nixon J. E., Powlowski N. E., Sinhuber R. O.* Lipids, **14**, 523 (1979).
272. *Anderson R., Kates M., Volcani B. E.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 557 (1979).
273. *Kobayashi K., Kanoh H.* Biochim. Biophys. Acta, **575**, 350 (1979).
274. *Morimoto K., Kanoh H.* Biochim. Acta, **531**, 16 (1978).
275. *Baranska J.* Biochim. Biophys. Acta, **619**, 258 (1980).
276. *Stoffel W., Melzner I. Z.* Physiol. Chem., **361**, 755 (1980).
277. *Skidmore W. D., Entenmann C. J.* Lipid Res., **3**, 471 (1962).
278. *Horrocks L. A. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **40**, 235 (1963).
279. *Chang C., Pike R. L., Clagett C. O.* Lipids, **13**, 167 (1978).
280. *Joutti A.* Biochim. Biophys. Acta, **575**, 10 (1979).
281. *Joutti A., Renkonen O. J.* Lipid Res., **20**, 230 (1979).
282. *Sherma J., Touchstone J. C. J.* High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **2**, 199 (1979).
283. *Touchstone J. C., Chen J. C., Bearer K. M.* Lipids, **15**, 61 (1980).
284. *Wodtke E.* Biochim. Biophys. Acta, **529**, 280 (1978).
285. *Finkel R. S., Volpe J. J.* Biochim. Biophys. Acta, **572**, 461 (1979).
286. *Perkins R. G., Scott R. E.* Lipids, **13**, 653 (1978).
287. *Hasegawa-Sasaki H., Ohno K.* Biochim. Biophys. Acta, **617**, 205 (1980).
288. *Daum G., Gamera G., Paltauf F.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 413 (1979).
289. *Hallman M., Kankare P.* Lipids, **14**, 435 (1979).
290. *Bligny R., Douce R.* Biochim. Biophys. Acta, **617**, 254 (1980).
291. *Broeckhuysen R. M.* Biochim. Biophys. Acta, **152**, 307 (1968).
292. *Montfort A., Boere W. A. M.* Lipids, **13**, 580 (1978).
293. *Zwaal R. F. A., Fluckinger R., Moser S., Zahler P.* Biochim. Biophys. Acta, **373**, 416 (1974).
294. *Jimeno-Abendano J., Zahler P.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 266 (1979).
295. *Tou J. S.* Biochim. Biophys. Acta, **572**, 307 (1979).
296. *Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.* Lipids, **5**, 494 (1970).
297. *Poorthuis B. J. H. M., Yazaki P. J., Hostetler K. Y. J.* Lipid Res., **17**, 433 (1976).
298. *Kean E. L. J.* Lipid Res., **7**, 449 (1966).
299. *Poorthuis B. J. H. M., Hostetler K. Y. J.* Lipid Res., **19**, 309 (1978).
300. *Post M., Batenburg J. J., van Golde L. L. M.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 308 (1980).
301. *Cho B. H. S., Irvine D. M., Ratray J. B. M.* Lipids, **12**, 983 (1977).
302. *Hostetler K. Y., Zenner B., Morris H. P.* Biochim. Biophys. Acta, **441**, 231 (1976).
303. *Hostetler K. Y., Zenner B., Morris H. P. J.* Lipid Res., **20**, 607 (1979).
304. *Yavin E., Zutra A.* Anal. Biochem., **80**, 430 (1977).
305. *Getz G. S., Jakovic S., Heywood J., Frank J., Rabinowitz M.* Biochim. Biophys. Acta, **218**, 441 (1970).
306. *Eichberg J., Gates J.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 90 (1979).
307. *Burns C. P., Wei S. P. L., Spector A. A.* Lipids, **13**, 666 (1978).
308. *Roughan P. R., Slack C. R.* Biochim. Biophys. Acta, **431**, 86 (1976).
309. *Tou J. S.* Biochim. Biophys. Acta, **531**, 167 (1978).

310. Lee T. C., Blank M. L., Piantodosi C., Ishay K. S., Snyder F. *Biochim. Biophys. Acta*, **409**, 218 (1975).
311. Blank M. L., Lee T. C., Piantodosi C., Ishay K. S., Snyder F. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 317 (1976).
312. Moore C., Lee T. C., Stephens N., Snyder F. *Biochim. Biophys. Acta*, **531**, 125 (1978).
313. Blank M. L., Snyder F., Byers L. W., Brooks B., Muirhead E. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1194 (1979).
314. Gray G. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 511 (1967).
315. Colard O., Bard D., Bereziat G., Polonovski J. *Biochim. Biophys. Acta*, **618**, 88 (1980).
316. Chapman G. W., Jr., Robertson J. A. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **54**, 195 (1977).
317. Chapman G. W. Jr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **57**, 299 (1980).
318. Hoffmann R., Ristow H. J., Pachowski H., Frank W. *Eur. J. Biochem.*, **49**, 317 (1974).
319. Vaskovsky V. E., Terekhova T. A. J. *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 671 (1979).
320. Horrocks L. A. J. *Lipid Res.*, **9**, 469 (1968).
321. Selvonchick D. P., Roots B. I. *Lipids*, **14**, 66 (1979).
322. Horrocks L. S., Sun G. Y. — In: *Research Methods in Neurochemistry*. Vol. 1/Eds. Marks N., Rodnight R. New York: Plenum, 1972, p. 223.
323. Sun G. Y. *Lipids*, **14**, 918 (1979).
324. Radomska-Pyrek A., Dabrowiecki Z., Horrocks L. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **574**, 248 (1979).
325. Nozawa Y., Thompson G. A. J. *Cell Biol.*, **49**, 712 (1971).
326. Kapoulas V. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 324 (1969).
327. Mason R., Huber G., Vaughan M. J. *Clin. Invest.*, **51**, 51 (1972).
328. Ackman R. G., Woyewoda A. D. J. *Chromatogr. Sci.*, **17**, 514 (1979).
329. Herslof B. — In: *Advances in Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*/Eds. Appelqvist L., Liljienberg C. Amsterdam: Elsevier, 1979, p. 301.
330. Taguchi R., Asahi Y., Ikezawa H. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 48 (1980).
331. Rouser G., Bauman A. J., Kritchevsky G., Heller D., O'Brien J. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 554 (1961).
332. Vorbeck M. L., Marinetti G. V. J. *Lipid Res.*, **6**, 3 (1965).
333. Saito T., Hakomori S. I. J. *Lipids Res.*, **12**, 257 (1971).
334. Anderson R., Livermore B. P., Kates M., Volcani B. E. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 77 (1978).
335. Anderson R., Kates M., Volcani B. E. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 89 (1978).
336. Ericson J. S., Radin N. S. J. *Lipid Res.*, **14**, 133 (1973).
337. Peters S. P., Aquino L., Naccarato W. F., Gilbertson J. R., Diven W. F., Glew R. H. *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 27 (1979).
338. Peters S. P., Glew R. H., Lee R. E. — In: *Practical Enzymology of Sphingolipidoses*/Eds. Glew R. H., Peters S. P. New York: Liss, 1977, p. 71.
339. Hirabayashi Y., Taki T., Matsumoto M., Kojima K. *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 96 (1978).
340. Svennerholm L., Bruce A., Mansson J. E., Rynmark B. M., Vanier M. T. *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 626 (1972).
341. Lewis G. M., Karli J. N., Mouloupoulos S. D. *Lipids*, **14**, 9 (1979).
342. Narasimhan R., Murray R. K. *Biochem. J.*, **179**, 199 (1979).
343. Yogeewaran G., Sheinin R., Wherret J. R., Murray R. K. *J. Biol. Chem.*, **247**, 5146 (1972).
344. Maget-Dana R., Michalski J. C. *Lipids*, **15**, 682 (1980).
345. Ando S., Isobe M., Nagai Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 98 (1976).
346. Ueno K., Ando S., Yu R. K. J. *Lipid Res.*, **19**, 863 (1978).
347. Suzuki A., Kundu S. K., Marcus D. M. J. *Lipid Res.*, **21**, 473 (1980).

348. *Nichols B. W., James A. T.* Fette, Seifen, Anstrichm., **66**, 1003 (1964).
349. *Winterbourn C. C. J.* Neurochem., **18**, 1153 (1971).
350. *Bremer E. G., Gross S. K., McCluer R. H. J.* Lipid Res., **20**, 1028 (1979).
351. *Fredman P., Nilsson O., Tayot J. L., Svennerholm L.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 42 (1980).
352. *Fishman P. H., Bradley R. M., Moss J., Manganiello V. C. J.* Lipid Res., **19**, 77 (1978).
353. *Ariga T., Ando S., Takahashi A., Miyatake T.* Biochim. Biophys. Acta, **618**, 480 (1980).
354. *Kojima K., Slomiany A., Murty V. L. N., Galicki N. I., Slomiany B. L.* Biochim. Biophys. Acta, **619**, 403 (1980).
355. *Ledeer R. W., Yu R. K., Eng L. F. J.* Neurochem., **21**, 829 (1973).
356. *Levis G. M., Karli J. N., Crumpton N. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **68**, 336 (1976).
357. *Slomiany A., Annese C., Slomiany B. L.* Biochim. Biophys. Acta, **441**, 316 (1976).
358. *Koscielak J., Maslinski W., Zielenski J., Zdebska E., Brudzynski T., Miller-Podraza H., Cedergren B.* Biochim. Biophys. Acta, **530**, 385 (1978).
359. *Iwamori M., Nagai Y.* Biochim. Biophys. Acta, **528**, 257 (1978).
360. *McCluer R. H., Evans J. E. J.* Lipid Res., **14**, 611 (1973).
361. *Jungatwala F. B., Hayes L., McCluer R. H. J.* Lipid Res., **18**, 285 (1977).
362. *Evans J. E., McCluer R. H.* Biochim. Biophys. Acta, **270**, 565 (1972).
363. *Ullman M. D., McCluer R. H. J.* Lipid Res., **18**, 371 (1977).
364. *Ullman M. D., McCluer R. H. J.* Lipid Res., **19**, 910 (1978).
365. *Watanabe K., Arao Y. J.* Lipid Res., **22**, 1020 (1981).
366. *Skipski V. P., Smolove A. F., Barclay M. J.* Lipid Res., **8**, 295 (1967).
367. *Pohl P., Glasl H., Wagner H. J.* Chromatogr., **49**, 488 (1970).
368. *Williams J. P., Watson G. R., Kahn M., Leung S., Kuksis A., Stachnyk O., Myher J. J.* Anal. Biochem., **66**, 110 (1975).
369. *Khan M.-U., Williams J. P. J.* Chromatogr., **140**, 179 (1977).
370. *Clayton T. A., MacMurray T. A., Morrison W. R. J.* Chromatogr., **47**, 277 (1970).
371. *De Silva N. S., Fowler H. W.* Phytochemistry, **15**, 1735 (1976).
372. *Sato N., Murata N., Miura Y., Ueta N.* Biochim. Biophys. Acta, **572**, 19 (1979).
373. *Sato N., Murata N.* Biochim. Biophys. Acta, **619**, 353 (1980).
374. *Svennerholm E., Svennerholm L.* Biochim. Biophys. Acta, **70**, 432 (1963).
375. *Coleman M. T., Yates A. J. J.* Chromatogr., **166**, 611 (1978).
376. *Svennerholm L., Vanier M.-T., Manson J.-E. J.* Lipids Res., **21**, 53 (1980).
377. *Mooghwinkel G. J. M., Borri P., Riemersma J. G.* Rec. Trav. Chim. Pays-Bas., **83**, 576 (1964).
378. *Grundt I. K., Stensland E., Syversen T. L. M. J.* Lipid Res., **21**, 162 (1980).
379. *Carter H. E., McCluer R. H., Slifter E. D. J.* Amer. Chem. Soc., **78**, 3735 (1956).
380. *Shaw N., Baddiley J.* Nature (London), **217**, 142 (1968).
381. *Fischer W., Ishizuka I., Landgraf H. R., Herrmann J.* Biochim. Biophys. Acta, **296**, 527 (1973).
382. *Tadano K., Ishizuka I.* Biochim. Biophys. Acta, **575**, 421 (1979).
383. *Sung S. S. J., Sweeley C. C.* Biochim. Biophys. Acta, **575**, 295 (1979).
384. *Hakomori S. I., Andrews H. D.* Biochim. Biophys. Acta, **202**, 225 (1979).
385. *Kuhn R., Wiegandt H.* Chem. Ber., **96**, 866 (1963).
386. *Wherrett J. R., Cummings J. N.* Biochem. J., **86**, 378 (1963).
387. *Puro K., Maury P., Huttunen J. K.* Biochim. Biophys. Acta, **187**, 230 (1969).
388. *Keenan T. W.* Biochim. Biophys. Acta, **337**, 225 (1974).
389. *Bushway A. A., Keenan T. W.* Lipids, **13**, 59 (1978).
390. *Keenan T. W., Schmid E., Franke W. W.* Lipids, **13**, 451 (1978).

391. Smith P. F. *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 367 (1980).
392. Seyfried T. N., Weber E. J., Yu R. K. *Lipids*, **12**, 979 (1977).
393. Ando S., Chang N. C., Yu R. K. *Anal. Biochem.*, **89**, 437 (1978).
394. Yates A. J., Thompson D. K., Boesel C. P., Albrightson C., Hart R. W. *J. Lipid Res.*, **20**, 428 (1979).
395. Schwarzmann G. *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 106 (1978).
396. Ohashi M. *Lipids*, **14**, 52 (1979).
397. de Vries B. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 184 (1963).
398. Özcimder M., Hammers W. E. J. *Chromatogr.*, **187**, 307 (1980).
399. Barrett C. B., Dallas M. S. J., Padley F. B. *Chem. Ind. (London)*, 1050 (1962).
400. Hartley F. R. *Chem. Rev.*, **73**, 163 (1973).
401. Guha O. K., Janák J., *J. Chromatogr.*, **68**, 325 (1972).
402. Dudley P. A., Anderson R. A. *Lipids*, **10**, 113 (1975).
403. Lie Ken Jie M. S. F., Lam C. H. *J. Chromatogr.*, **124**, 147 (1976).
404. Minnikin D. E., Patel P. V., Goodfellow M. *FEBS Lett.*, **39**, 322 (1974).
405. Rao G. A., Kilpatrick R. L., Goheen S. C., Larkin E. C. *Lipids*, **15**, 686 (1980).
406. Ilinov P. P. *Lipids*, **14**, 598 (1979).
407. Heath R. R., Tomlinson J. H., Doo Little R. E., Proveaux A. T. *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 380 (1975).
408. Warthen J. D., Jr. *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 513 (1976).
409. Neville M. E., Jr., Miin T. C., Ferguson K. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 201 (1979).
410. Hammers W. E., Spanjer M. C., de Ligny C. L. *J. Chromatogr.*, **174**, 291 (1979).
411. Lam S., Grushka E. J. *Chromatogr. Sci.*, **15**, 234 (1977).
412. Adlof R. O., Rakoff H., Emken E. A. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **57**, 273 (1980).
413. Adlof R. O., Emken E. A. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **57**, 276 (1980).
414. Schofield C. R., Mounts T. L. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **54**, 319 (1977).
415. Emken E. A., Hartman J. C., Turner C. R. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **55**, 561 (1978).
416. Schofield C. R. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **57**, 331 (1980).
417. Mordret F., Prevot A., Le Barbachon N., Barbati C. *Rev. Trans. Corps. Gras*, **24**, 467 (1977).
418. Schofield C. R. — In: *Geometrical and Positional Fatty Acid Isomers*/Eds. Emken E. A., Dutton H. J. Champaign, IL: Oil Chem. Society, 1979, p. 17.
419. Glass R. L., Krick T. P., Olson D. L., Thorson R. L. *Lipids*, **12**, 828 (1977).
420. Crudwell E., Cripps A. L. *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 161 (1976).
421. James A. T. — In: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 8/Ed. Glick D. New York: Interscience, 1960, p. 1.
422. Ackman R. G. *Progr. Chem. Fats Other Lipids*, **7**, 41 (1972).
423. Kuksis A. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **71**, 130 (1971).
424. Nicolaidis N., Apon J. M. B., Wong D. H. *Lipids*, **11**, 781 (1976).
425. Myher J. J., Marai L., Kuksis A. *Anal. Biochem.*, **62**, 188 (1974).
426. Sheppard A. J., Iverson J. L., Weinrauch J. L. — In: *Fatty Acids and Glycerides*, Vol. 1/Ed. Kuksis A. New York: Plenum Press, 1978, p. 341.
427. Emken E. A. — In: *Fatty Acids and Glycerides*. Vol. 1/Ed. Kuksis A. New York: Plenum Press, 1978, p. 77.
428. Tanaka K., Yu G. M. *Clin. Chim. Acta*, **43**, 151 (1973).
429. Allen G. R., Saxby M. J. *J. Chromatogr.*, **37**, 312 (1968).
430. Ashes J. R., Haken J. K. *J. Chromatogr.*, **111**, 171 (1975).
431. Ottenstein D. M., Supina W. R. *J. Chromatogr.*, **91**, 119 (1974).
432. Ashes J. R., Haken J. K., Mills S. C. *J. Chromatogr.*, **187**, 297 (1980).
433. Christie W. W., Holman R. T. *Lipids*, **1**, 176 (1966).

434. *Sen Gupta A. K., Peeters H.* Chem. Phys. Lipids, **3**, 371 (1969).
435. *Oshima M., Ariga T. J.* Biol. Chem., **250**, 6963 (1975).
436. *Glass R. L., Krick T. P., Sand D. M., Rahn C. H., Schlenk H.* Lipids, **10**, 695 (1975).
437. *Emken E. A.* Lipids, **7**, 459 (1972).
438. *Emken E. A., Dutton H. J.* Lipids, **9**, 272 (1974).
439. *Rakoff H., Emken E. A.* Lipids, **12**, 760 (1977).
440. *Ottenstein D. M., Bartley D. A., Supina W. R. J.* Chromatogr., **119**, 401 (1976).
441. *Golovnya R. V., Uralets V. P., Kuzmenko T. E. J.* Chromatogr., **121**, 118 (1976).
442. *Jaeger H., Kloer H. U., Ditschuneit H. J.* Lipid Res., **17**, 185 (1976).
443. *Kobayashi T. J.* Chromatogr., **194**, 404 (1980).
444. *Slover H. T., Lanza E. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **56**, 933 (1979).
445. *Patton G. M., Cann S., Brunengraber H., Lowenstein J. M.* Methods Enzymol., **72**, 8 (1981).
446. *Lam C. H., Lie Ken Jie M. S. F. J.* Chromatogr., **117**, 365 (1976).
447. *Lam C. H., Lie Ken Jie M. S. F. J.* Chromatogr., **121**, 303 (1976).
448. *Lie Ken Jie M. S. F., Lam C. H. J.* Chromatogr., **97**, 165 (1974).
449. *Lie Ken Jie M. S. F. J.* Chromatogr., **111**, 189 (1975).
450. *Lam C. H., Lie Ken Jie M. S. F. J.* Chromatogr., **115**, 559 (1975).
451. *Lie Ken Jie M. S. F. J.* Chromatogr., **109**, 81 (1975).
452. *Jamieson G. R., McMinn A. L., Reid E. H. J.* Chromatogr., **178**, 555 (1979).
453. *Zeman I. J.* Gas Chromatogr., **3**, 18 (1965).
454. *Yano I., Kageyama K., Ohno Y., Masui M., Kusonose E., Akimori N.* Biomed. Mass Spectrom., **5**, 14 (1978).
455. *Toriyama S., Yano I., Kusunose M., Kusunose E.* FEBS Lett., **15**, 111 (1978).
456. *Takagi T., Sakai A., Itabashi Y., Hayashi K.* Lipids, **12**, 228 (1977).
457. *König W. A., Benecke I. J.* Chromatogr., **195**, 292 (1980).
458. *Engelhard H., Elgass H. J.* Chromatogr., **158**, 249 (1978).
459. *Cooper M. J., Anders M. W.* Anal. Chem., **46**, 1849 (1974).
460. *Grushka E., Durst H. D., Kikta E. J., Jr. J.* Chromatogr., **112**, 673 (1975).
461. *Jordi H. C. J.* Liquid Chromatogr., **1**, 215 (1978).
462. *Distler W. J.* Chromatogr., **192**, 240 (1980).
463. *Weatherston J., MacDonald L. M., Blake T., Benn M. H., Huang Y. Y. J.* Chromatogr., **161**, 347 (1978).
464. *Pei P. T. S., Kossa W. C., Ramachandran S., Henly R. S.* Lipids, **11**, 814 (1976).
465. *Warthen J. D., Jr. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **52**, 151 (1975).
466. *Schofield C. R. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **52**, 36 (1975).
467. *Schofield C. R.* Anal. Chem., **47**, 1417 (1975).
468. *Bailie A. G., Jr., Wilson T. D., Beebe J. M., Stuart J. D. J.* Chromatogr. Sci. (1982).
469. *Kleiman R., Spencer C. F., Tjarks L. W., Earle F. R.* Lipids, **6**, 617 (1971).
470. *Bohannon M. B., Kleiman R.* Lipids, **10**, 703 (1975).
471. *Morris L. J. J.* Lipid Res., **7**, 717 (1969).
472. *Ramwell P. W., Daniels E. G.* — In: Lipid Chromatographic Analysis, Vol. 2./Ed. Marinetti G. V. New York: 1968, p. 313.
473. *Bundy G. L., Daniels E. G., Lincoln F. H., Pike J. E. J.* Amer. Chem. Soc., **94**, 2124 (1972).
474. *Merritt M. V., Bronson G. E.* Anal. Biochem., **80**, 392 (1977).
475. *Tulloch A. P. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **41**, 833 (1964).
476. *Tulloch A. P., Mazurek M.* Lipids, **11**, 228 (1976).
477. *O'Brien J. S., Rouser G.* Anal. Biochem., **7**, 288 (1964).
478. *Karlsson K. A., Pascher J.* Chem. Phys. Lipids, **12**, 65 (1974).

479. *Conacher H. B. S., Gunstone F. D.* Chem. Phys. Lipids, **3**, 203 (1969).
480. *Wood R., Beaver E. L., Snyder F.* Lipids, **1**, 399 (1966).
481. *Wood R.* Lipids, **2**, 199 (1967).
482. *Fitzpatrick F. A.* — In: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 5./Ed. Frohlich J. C. New York: Raven, 1978, p. 95.
483. *Fitzpatrick F. A., Stringfellow D. A., Maclouf J., Rigaud M. J.* Chromatogr., **177**, 51 (1979).
484. *Nicosia S., Galli G.* Anal. Biochem., **61**, 192 (1974).
485. *Jouvenaz G. H., Nugteren D. H., Berthuis R. K., van Dorp D. A.* Biochim. Biophys. Acta, **202**, 231 (1970).
486. *Jouvenaz G. H., Nugteren D. H., van Dorp D. A.* Prostaglandins, **3**, 175 (1973).
487. *Wickramasinghe J. A. F., Morozowich W., Hamlin W. E., Shaw S. R.* J. Pharm. Sci., **62**, 1428 (1973).
488. *Wickramasinghe J. A. F., Shaw S. R.* Biochem. J., **141**, 179 (1974).
489. *DeDechere E. A. M., Nugteren D. H., ten Hoor D.* Nature (London), **268**, 160 (1977).
490. *Fitzpatrick F. A., Wynalda M. A., Kaiser D. G.* Anal. Chem., **49**, 1032 (1977).
491. *Skrinska V. A., Butkus A.* Prostaglandins, **16**, 571 (1978).
492. *Levitt M. J., Josimovich J. B., Broskin K. D.* Prostaglandins, **1**, 121 (1972).
493. *Middleditch B. S., Desiderio D. M.* Prostaglandins, **2**, 195 (1972).
494. *Nugteren D. J.* Biol. Chem., **250**, 2808 (1975).
495. *Pace-Asciak C., Wolfe L. S. J.* Chromatogr., **56**, 129 (1971).
496. *Szederkenyi F., Kovacs G.* Prostaglandins, **8**, 285 (1974).
497. *Kelly R. W., Taylor P. L.* Anal. Chem., **48**, 465 (1976).
498. *Rigaud M., Chebroux P., Durand J., Maclouf J., Mandani C.* Tetrahedron Lett., **44**, 3935 (1976).
499. *Maclouf J., Rigaud M., Durand J., Chebroux P.* Prostaglandins, **11**, 999 (1976).
500. *Fitzpatrick F. A.* Anal. Chem., **50**, 47 (1978).
501. *Green K., Hamberg M., Samuelsson B.* — In: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 1/Eds. Samuelsson B., Paoletti R. New York: Raven, 1976, p. 47.
502. *Green K., Hamberg M., Samuelsson B., Smigel M., Frohlich J. C.* — In: Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 5/Ed. Frohlich J. C. New York: Raven, 1978, p. 39.
503. *Ferretti A., Flanagan V. P.* Lipids, **14**, 483 (1979).
504. *Porter N. A., Wolf R. A., Weenen H.* Lipids, **15**, 163 (1980).
505. *Porter N. A., Wolf R. A., Yarbrow E. M., Weenen H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **89**, 1058 (1979).
506. *Porter N. A., Logan J., Kontoyiannidou V. J.* Org. Chem., **44**, 3177 (1979).
507. *Fitzpatrick F. A.* Anal. Chem., **48**, 499 (1976).
508. *Merritt M. V., Bronson G. E.* Anal. Chem., **48**, 1851 (1976).
509. *Oesterling T. O., Morozowitch W., Roseman T. J.* J. Pharm. Sci., **61**, 1861 (1972).
510. *Cho M. J., Allen M. A.* Prostaglandins, **15**, 943 (1978).
511. *Turk J., Weiss S. J., Davis J. E., Needleman P.* Prostaglandins, **16**, 291 (1978).
512. *Whorton A. R., Carr K., Smigel M., Walker L., Ellis K., Oates J. A.* J. Chromatogr., **163**, 64 (1979).
513. *Whorton A. R., Sweetman B. J., Oates A. J.* Anal. Biochem., **98**, 455 (1979).
514. *Hill G. T.* J. Chromatogr., **176**, 407 (1979).

515. Wynalda M. A., Lincoln F. H., Fitzpatrick F. A. J. *Chromatogr.*, **176**, 413 (1979).
516. Inayama S., Hori H., Shibata T., Ozawa Y., Yamagami K., Imazu M., Hayashida H. J. *Chromatogr.*, **194**, 85 (1980).
517. Van Rollins M., Ho S. H. K., Greenwald J. E., Alexander M., Dorman N. J., Wong L. K., Horrocks L. A. *Prostaglandins*, **20**, 571 (1980).
518. Russell F. A., Deykin D. *Prostaglandins*, **18**, 11 (1979).
519. Nagayo K., Mizuno N. J. *Chromatogr.*, **178**, 347 (1979).
520. Hansen H. S., Bukhave K. *Prostaglandins*, **16**, 311 (1978).
521. Granstrom E. *Ann. Clin. Biochem.*, **16**, 354 (1979).
522. Gunstone F. D., Padley F. B. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 957 (1965).
523. Fatemi S. H., Hammond E. G. *Lipids*, **12**, 1037 (1977).
524. Takagi T., Itabashi Y. *Lipids*, **12**, 1062 (1977).
525. Myher J. J., Marai L., Kuksis A., Kritchevsky D. *Lipids*, **12**, 775 (1977).
526. Wessels H., Rajagopalan N. S. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **71**, 543 (1969).
527. Conacher H. B. S., Gunstone F. D., Hornby G. M., Padley F. B. *Lipids*, **5**, 434 (1970).
528. Gunstone F. D., Qureshi M. I. *J. Sci. Food Agr.*, **19**, 356 (1968).
529. van der Wal R. J. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 1155 (1965).
530. Johnson A. R., Murray K. E., Fogerty A. C., Kennett B. H., Pearson J. A., Schenstone F. S. *Lipids*, **2**, 316 (1967).
531. Snyder F., Cress E. A., Stephens N. *Lipids*, **1**, 381 (1966).
532. van Golde L. M. G., van Deenen L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 496 (1966).
533. van Golde L. M. G., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M. *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 84 (1968).
534. Kuksis A. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **73**, 332 (1971).
535. Renkonen O. *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 288 (1966).
536. Kuksis A., Marai L. *Lipids*, **2**, 217 (1967).
537. Myher J. J., Kuksis A., Marai L., Yeung S. K. *F. Anal. Chem.*, **50**, 430 (1978).
538. Morris L. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 340 (1965).
539. Renkonen O. *Lipids*, **3**, 191 (1968).
540. Kuksis A., Marai L., Breckenridge W. C., Gornall D. A., Stachnyk O. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 511 (1968).
541. Itabashi Y., Takagi T. *Lipids*, **15**, 205 (1980).
542. Nakamura M., Kawamoto T., Akino T. *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 24 (1980).
543. Ikano G., Kawamoto T., Akino T. *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 285 (1978).
544. Renkonen O. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 298 (1965).
545. Yeung S. K. F., Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **52**, 830 (1974).
546. Wood R., Snyder F. *Lipids*, **1**, 62 (1966).
547. Lin H. J., Lie Ken Jie M. S. F., Ho F. C. S. *J. Lipid Res.*, **17**, 53 (1976).
548. Hallgren B., Stallberg G. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 1519 (1967).
549. Itoh T., Tanaka M., Kaneko H. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **56**, 191A (1979).
550. Smith E. C., Jones A. D., Hammond E. W. *J. Chromatogr.*, **188**, 205 (1980).
551. Kuksis A., McCarthy M. J. *Can. J. Biochem.*, **40**, 679 (1962).
552. Eckert W. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **79**, 360 (1977).
553. Schmid P. P., Muller M. D., Simon W. J. *High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 675 (1979).
554. Monseigny A., Vigneron P. V., Levacq M., Zwoboda I. *Rev. Corps Gras*, **26**, 107 (1979).
555. Grob K., Jr., Neukom P., Battaglia B. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **75**, 282 (1980).

556. Kuksis A., Myher J. J., Geher K., Breckenridge W. C., Jones G. J. L., Little J. A. J. *Chromatogr.*, **224**, 1 (1981).
557. D'Alonzo R. P., Kozarek W. J., Wharton H. W. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **58**, 215 (1981).
558. Kuksis A. — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. Vol. 1/Ed. Marinetti G. V. New York: Marcel Dekker, 1967, p. 239.
559. Litchfield C., Harlow R. D., Reiser R. *Lipids*, **2**, 363 (1969).
560. Powell R. G., Kleiman R., Smith C. R., Jr. *Lipids*, **4**, 450 (1969).
561. Fioriti J. A., Kanuk M. J., Sims R. J. J. *Chromatogr.*, **7**, 448 (1969).
562. Wood R., Snyder F. J. *Lipid Res.*, **8**, 494 (1967).
563. Blank M. L., Kasama K., Snyder F. J. *Lipid Res.*, **13**, 390 (1972).
564. Kuksis A. — In: *Analysis of Lipid and Lipoproteins*/Ed. Perkins E. G. Champaign, IL: Amer. Oil Chem. Society, 1975, p. 36.
565. Horning M. G., Casparini G., Horning E. C. J. *Chromatogr., Sci.*, **7**, 267 (1969).
566. Kuksis A., Stachnyk O., Holub B. J. J. *Lipid Res.*, **10**, 660 (1969).
567. Saito K., Ogino H., Satouchi K. — In: *Membrane Fluidity*/Ed. Kates M., Kuksis A. Clifton, NJ: Humana, 1980, p. 33.
568. Breckenridge W. C., Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **53**, 1184 (1975).
569. Smith C. R., Jr., Madrigal R. V., Weisleder D., Plattner R. D. *Lipids*, **12**, 736 (1977).
570. Kuksis A., Breckenridge W. C. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 978 (1965).
571. Watts R., Dils R. J. *Lipid Res.*, **9**, 40 (1968).
572. Lohninger A., Nikiforov A. J. *Chromatogr.*, **192**, 185 (1980).
573. Kuksis A., Marai L., Breckenridge W. C., Gornall D. A., Stachnyk O. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 511 (1968).
574. Holub B. J., Breckenridge W. C., Kuksis A. *Lipids*, **6**, 307 (1971).
575. Holub B. J., Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **49**, 1347 (1971).
576. Nakamura M., Onodera T., Akino T. *Lipids*, **15**, 616 (1980).
577. Ishidate K., Weinhold P. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **664**, 133 (1981).
578. Renkonen O. *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 575 (1967).
579. Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **49**, 1245 (1971).
580. Kuksis A. J. *Chromatogr.*, **10**, 53 (1972).
581. Myher J. J., Kuksis A. J. *Chromatogr. Sci.*, **13**, 138 (1975).
582. Dyer A., Klopfenstein E. *Lipids*, **12**, 889 (1977).
583. Myher J. J., Kuksis A. *Can. J. Biochem.*, **69** (1982).
584. Myher J. J., Kuksis A. *Lipids*, **9**, 382 (1974).
585. Snyder F. — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. Vol. 1/Ed. Marinetti G. V. New York: Marcel Dekker, 1976, p. 111.
586. Wood R., Raju P. K., Reiser R. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **42**, 161 (1965).
587. Friedberg S. J., Halpert M. J. *Lipid Res.*, **19**, 57 (1978).
588. Gaskell S. J., Edmonds C. G., Brooks C. J. W. *Anal. Lett.*, **9**, 325 (1976).
589. Myher J. J., Marai L., Kuksis A. J. *Lipid Res.*, **15**, 586 (1974).
590. Poole C. F., Zlatkis A. J. *Chromatogr.*, **184**, 99 (1980).
591. Rock C. O., Snyder F. *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 631 (1975).
592. Bauman W. J., Madson T. H., Weseman B. J. J. *Lipid Res.*, **13**, 640 (1972).
593. Wood R., Piantodosi C., Snyder F. J. *Lipid Res.*, **10**, 370 (1969).
594. Takagi T., Itabashi Y., Ota K., Hayashi K. *Lipids*, **11**, 354 (1976).
595. Nickel E. C., Privett O. S. *Separ. Sci.*, **2**, 307 (1967).
596. Nyström E., Sjövall J. *Anal. Chem.*, **6**, 155 (1973).
597. Ellingboe J. E., Nyström J. F., Sjövall J. *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 803 (1968).
598. Ellingboe J. E., Nyström J. F., Sjövall J. J. *Lipid Res.*, **11**, 266 (1970).
599. Nyström E., Sjövall J. *Methods Enzymol.*, **35**, 378 (1975).
600. Lindqvist B., Sjörgen I., Nordin R. J. *Lipid Res.*, **15**, 65 (1974).
601. Curstedt T., Sjövall J. *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 24 (1974).

602. *Curstedt T., Sjövall J.* Biochim. Biophys. Acta, **369**, 173 (1974).
603. *Plattner R. D., Spencer G. F., Kleiman R. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **54**, 511 (1977).
604. *Pei P. T. S., Henly R. S., Ramachandran S.* Lipids, **10**, 152 (1975).
605. *Bezard J. A., Ouedraogo M. A. J.* Chromatogr., **196**, 279 (1980).
606. *Plattner R. D., Wade K., Kleiman R. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **55**, 381 (1978).
607. *Plattner R. D. J.* Amer. Oil Chem. Soc., **58**, 638 (1981).
608. *Fallon W. E., Shimizu Y.* Lipids, **12**, 765 (1977).
609. *Karlsson K. A., Pascher I. J.* Lipid Res., **12**, 466 (1971).
610. *Morrison W. R.* Biochim. Biophys. Acta, **176**, 537 (1969).
611. *Karlsson K. A.* Biochem. J., **97**, 39P (1969).
612. *Bouhours J. F., Guignard H. J.* Lipid Res., **20**, 897 (1979).
613. *Ballio A., Casinovi C. G., Framondino M., Marino G., Santurba-ni B.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 51 (1979).
614. *Vunnam R. R., Radin N. S.* Biochim. Biophys. Acta, **573**, 73 (1979).
615. *Samuelsson B., Samuelsson K. J.* Lipid Res., **10**, 47 (1969).
616. *Samuelsson K.* Scand. J. Clin. Invest., **27**, 371 (1971).
617. *Kuksis A.* Fette, Seifen, Anstrichm., **75**, 317 (1973).
618. *Samuelsson B., Samuelsson K.* Biochim. Biophys. Acta, **164**, 421 (1968).
619. *Casparini G., Horning E. C., Horning M. G.* Chem. Phys. Lipids, **3**, 1 (1969).
620. *Hammarstrom S. J.* Lipid Res., **11**, 175 (1970).
621. *Huang R. T. C. Z.* Physiol. Chem., **352**, 1306 (1971).
622. *Kuksis A., Myher J. J., Breckenridge W. C., Little J. A.* — In: Report on the High Density Lipoprotein Methodology Workshop./Ed. Lippel K. Bethesda, MD: NIH Publ. No. 79—1661, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1979, p. 142.
623. *Myher J. J., Kuksis A., Breckenridge W. C., Little J. A.* Can. J. Biochem., **59**, 626 (1981).
624. *Sugita M., Iwamori N., Evens J. E., McCluer R. H., Dulaney J. T., Moser H. W. J.* Lipid Res., **15**, 223 (1979).
625. *Iwamori M., Moser H. W.* Clin. Chem., **21**, 725 (1975).
626. *Iwamori M., Costello C., Moser H. W. J.* Lipid Res., **20**, 86 (1979).
627. *Do U. H., Pei P. T., Minard R. D.* Lipids, **16**, 855 (1981).
628. *Smith M., Monchamp P., Jungatwala F. B. J.* Lipid Res., **22**, 714 (1981).
629. *Waku K., Nakazawa Y. J.* Biochem. (Tokyo), **72**, 149 (1972).
630. *Wood R., Harlow R. D.* Arch. Biochem. Biophys., **135**, 272 (1969).
631. *Marai L., Kuksis A.* Can. J. Biochem., **51**, 1365 (1973).
632. *Arvidson G. A. E. J.* Lipid Res., **6**, 574 (1965).
633. *Arvidson G. A. E.* Eur. J. Biochem., **4**, 478 (1968).
634. *Holub B. J., Kuksis A.* Lipids, **4**, 466 (1969).
635. *Siebertz H. P., Heinz E., Joyard J., Douce R.* Eur. J. Biochem., **108**, 177 (1980).
636. *Heinz E., Harwood J. L. Z.* Physiol. Chem., **358**, 897 (1977).
637. *Wurst C. F., Copenhaver J. H.* Lipids, **1**, 422 (1966).
638. *Baer E., Maurukas J. J.* Biol. Chem., **212**, 29 (1955).
639. *Renkonen O. J.* Lipid Res., **9**, 34 (1968).
640. *Collins F. D.* — In: New Biochemical Separations./Ed. James A. T., Morris L. J. London: Van Nostrand, 1965, p. 380.
641. *Shamgar F. A., Collins F. D.* Biochim. Biophys. Acta, **409**, 104 (1975).
642. *Luthra M. G., Sheltawy A.* Biochem. J., **126**, 1231 (1972).
643. *Shimojo T., Abe M., Ohta M. J.* Lipid Res., **15**, 525 (1975).
644. *Shaw J. M., Bottino N. R. J.* Lipid Res., **15**, 317 (1974).
645. *Bottino N. R.* Lipids, **13**, 18 (1978).
646. *Tanaka M., Itoh T., Kaneko H.* Yakugaku, **28**, 96 (1979).
647. *King R. J., Clements J. A. J.* Lipid Res., **11**, 381 (1970).

648. Arvidson G. A. E. J. Chromatogr., **103**, 201 (1975).
649. Porter N. A., Wolf R. A., Nixon J. R. Lipids, **14**, 20 (1979).
650. Crawford C. G., Plattner R. D., Sessa D. J., Rackis J. J. Lipids, **15**, 91 (1980).
651. Nichols B. W., Moorhouse R. Lipids, **4**, 311 (1969).
652. Eccleshall T. R., Hawke J. C. Phytochemistry, **10**, 3035 (1971).
653. Siebertz M., Heinz E. Z. Physiol. Chem., **358**, 27 (1977).
654. Siebertz H. P., Heinz E., Linsheid M., Joyard J., Douce R. Eur. J. Biochem., **101**, 429 (1979).
655. Araunga R. D., Morrison W. R. Lipids, **6**, 768 (1971).
656. Auling G., Heinz E., Tulloch A. P. Z. Physiol. Chem., **352**, 905 (1971).
657. Oshima M., Ariga T., Murata T. Chem. Phys. Lipids, **19**, 289 (1977).
658. Hammarstrom S., Samuelson B. J. Biol. Chem., **247**, 1001 (1972).
659. Nonaka G., Kishimoto Y. Biochim. Biophys. Acta, **572**, 423 (1979).
660. Yahara S., Singh I., Kishimoto Y. Biochim. Biophys. Acta, **619**, 177 (1980).
661. Chou K. H., Ambers L. S. A., Jungatwala F. B. J. Neurochem., **23**, 863 (1979).
662. Das S. K., McCullough M. S. Lipids, **15**, 932 (1980).
663. Bowyer D. E., Leat W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A. Biochim. Biophys. Acta, **70**, 423 (1963).
664. Ko H., Royer M. E. J. Chromatogr., **88**, 253 (1974).
665. Kuksis A., Kovacevic N., Lau D., Vranic M. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., **34**, 2238 (1975).
666. Breckenridge W. C., Kuksis A. Can. J. Biochem., **53**, 1170 (1975).
667. Kuksis A. Chromatogr. Rev., **8**, 172 (1966).
668. Shand J. H., Noble R. C. Anal. Biochem., **101**, 427 (1980).
669. Rogiers V. J. Chromatogr., **182**, 27 (1980).
670. Rogiers V., Crokaert R., Vis H. L. Clin. Chim. Acta, **105**, 105 (1980).
671. Gornall D. A., Kuksis A. J. Lipid Res., **14**, 197 (1973).
672. Mookerjee S., Park C. E., Kuksis A. Lipids, **10**, 374 (1975).
673. Daniel L. W., Kucera L. S., Waite M. J. Biol. Chem., **255**, 5697 (1980).
674. Kramer J. K. G., Hulan H. W. Lipids, **12**, 159 (1977).
675. Stremmel W., Debuch H. Biochim. Biophys. Acta, **573**, 301 (1979).
676. Debuch H. J. Neurol., **215**, 261 (1977).
677. Akesson B., Gronowitz S., Herslof B., Ohlson R. Lipids, **13**, 338 (1978).
678. Takatori T., Phillips F. C., Shimasaki H., Privett O. S. Lipids, **11**, 272 (1976).
679. Sano M., Privett O. S. Lipids, **15**, 337 (1980).
680. Privett O. S., Dougherty K. A., Castell J. D. Amer. J. Clin. Nutr., **24**, 1265 (1971).
681. Privett O. S., Dougherty K. A., Erdahl W. L. — In: Quantitative Thin-Layer Chromatography./Ed. Touchstone J. C. New York: Wiley, 1973, p. 57.
682. Pollet S., Ermidou S., Le Saux F., Monge M., Baumann V. J. Lipid Res., **19**, 916 (1978).
683. Raheja R. K., Kaur C., Singh A., Bhatia I. S. J. Lipid Res., **14**, 695 (1973).
684. Awad A. B. Lipids, **13**, 850 (1978).
685. Hojnacki J. L., Nicolosi R. J., Hayes K. C. J. Chromatogr., **128**, 133 (1976).
686. Sherma J., Touchstone J. C. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **1**, 199 (1979).
687. Downing D. T., Stranieri A. M. J. Chromatogr., **192**, 208 (1980).
688. Kabara J. J., Chen J. S. Anal. Chem., **48**, 814 (1976).
689. Bitman J., Wood D. L., Ruth J. M. J. Amer. Oil Chem. Soc., **57** (1980), Abstr. No. 384.
690. Segura R., Gotto A. M., Jr. J. Chromatogr., **99**, 643 (1974).
691. Segura R., Gotto A. M. Clin. Chem., **21**, 991 (1975).
692. Kupke I. R., Zeugner S. J. Chromatogr., **146**, 261 (1978).

693. *Segura R., Navarro X. J.* Amer. Oil Chem. Soc., 57 (1980), Abstr. No. 387.
694. *Moore W. E. C.* Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 535 (1970).
695. *Okumura T., Kadono T.* Bunseki Kagaku, 22, 980 (1973).
696. *Okumura T., Kadono T., Iso'o A. J.* Chromatogr., 108, 329 (1975).
697. *Sipos J. C., Ackman R. G. J.* Chromatogr. Sci., 16, 443 (1978).
698. *Ranayake N. N., Ackman R. G.* Lipids, 14, 795 (1979).
699. *Christie W. W., Hunter M. L. J.* Chromatogr., 171, 517 (1979).
700. *Vandamme D., Blaton V., Peeters H. J.* Chromatogr., 145, 151 (1978).
701. *Vandamme D., Vankerckhoven G., Vercaemst R., Soetewey F., Blaton V., Peeters H., Rosseneau M.* Clin. Chim. Acta, 89, 231 (1978).
702. *Bradley D. M., Richards C. R., Thomas N. S. T.* Clin. Chim. Acta, 92, 293 (1979).
703. *Shishido N., Isobe T., Horii I., Shishido N., Uda K. J.* Toxicol Sci., 1, 95 (1976).
704. *Itoh T., Waki H., Kaneko H.* Agr. Biol. Chem., 39, 2365 (1975).
705. *Kaneko H., Hosohara M., Tanaka M., Itoh T.* Lipids, 11, 837 (1976).
706. *Tanaka M., Itoh T., Kaneko H.* Yakugaku, 26, 454 (1977).
707. *Glueck L., Kulovich M. V., Borer R. C., Brenner P. H., Anderson G. G., Spellacy V. N.* Amer. J. Obst. Gynecol., 109, 440 (1971).
708. *Olson E. B., Graven S. N.* Clin. Chem., 20, 1408 (1974).
709. *Mallikarjuneswara V. R.* Clin. Chem., 21, 260 (1975).
710. *Martin-Pouthier A., Porchet N., Fruchart J. C., Sezille G., Dewailly P., Codaccioni X., Delecour M.* Clin. Chem., 25, 31 (1979).
711. *Kuksis A., Marai I., Gornall D. A. J.* Lipid Res., 8, 352 (1967).
712. *Mercer N. J. H., Holub B. J.* Lipids, 14, 1009 (1979).
713. *Kuksis A.* Fette, Seifen, Anstrichm., 75, 517 (1973).
714. *Kuksis A., Myher J. J., Marai L., Geher K. J.* Chromatogr. Sci., 13, 423 (1975).
715. *Watts R. B., Carter T., Taylor S.* Clin. Chem., 22, 1692 (1976).
716. *Kuksis A., Myher J. J., Geher K., Hoffman A. G. D., Breckenridge W. C., Jones G. J. L., Little J. A. J.* Chromatogr., 146, 393 (1978).
717. *Kuksis A., Myher J. J., Geher K., Shaikh N. A., Breckenridge W. C., Jones G. J. L., Little J. A. J.* Chromatogr., 182, 1 (1980).
718. *Hedlin R., Kuksis A., Geher K.* Obst. Genycol., 52, 430 (1978).
719. *Griffin E., Breckenridge W. C., Kuksis A., Bryan M. H., Angel A. J.* Clin. Invest., 64, 1703 (1979).
720. *Kuksis A., Myher J. J., Geher K., Jones G. J., Shepherd J., Packard C. J., Morisett J. D., Taunton O. D., Gotto A. M.* Atherosclerosis, 41, 221 (1982).
721. *Mareš P., Turzická E., Tamchyna V. J.* Chromatogr., 146, 241 (1978).
722. *Skořepa J., Mareš P., Rubličová J., Vinogradov S. J.* Chromatogr., 162, 177 (1979).
723. *Mareš P., Turzická E., Skořepa J. J.* Chromatogr., 164, 331 (1979).
724. *Grob K., Jr.* J. Chromatogr., 205, 289 (1981).
725. *Myher J. J., Kuksis A.* (1981) unpublished results.
726. *Hirsch J. J.* Lipid Res., 4, 1 (1963).
727. *Duncan I. W., Culbreth P. H., Burtis C. A. J.* Chromatogr., 162, 281 (1979).
728. *Smith S. L., Novotný M., Moore S. A., Felten D. L. J.* Chromatogr., 221, 19 (1980).
729. *Coupek J., Mareš P. J.* Amer. Oil Chem. Soc., 57 (1980), Abstr. No. 89.
730. *Privett O. S., Erdahl W. L.* Methods Enzymol., 72, 56 (1981).
731. *Compton B. J., Purdy W. C.* Anal. Chim. Acta (1981).

Глава 5

Терпены

Родней Кротью, Роберт К. Рональд

5.1. Введение

К терпенам, составляющим одну из самых больших групп природных соединений, относятся весьма разнообразные по своему строению вещества, которые обладают различными хроматографическими свойствами, причем это различие прослеживается не только при переходе от одного класса вещества к другому, но и в пределах одного и того же класса. Приводимый в этой главе материал вполне можно было бы сгруппировать в соответствии с хроматографическими свойствами или важнейшими методами разделения рассматриваемых соединений, однако мы решили придерживаться схемы изложения, принятой в предыдущих изданиях, т. е. в рамках отдельных разделов описывать разделение близкородственных соединений, молекулы которых построены из одинакового числа изопреноидных звеньев, поскольку такой подход облегчает читателю поиск необходимой информации о хроматографических свойствах определенных классов терпенов. В связи с этим следует отметить, что, несмотря на существенные различия некоторых физических характеристик (в частности, величин давления паров) терпенов, принадлежащих к различным классам, определенные хроматографические свойства близких структурных аналогов (например, ряда непредельных моно-, сескви- и дитерпенов) и проблемы, связанные с их разделением, очень схожи. Мы попытались свести к минимуму возможность повторений, поэтому в некоторых случаях ту или иную информацию об интересующем читателя соединении следует искать в разделах, посвященных описанию хроматографических свойств структурных аналогов такого соединения. Изопреноидные витамины (А, Е и К) рассмотрены каждый в отдельности; сведения о витаминах группы D даны в разд. 5.3. Поскольку фосфорилированные и гликозилированные терпены по хроматографическим свойствам существенно отличаются от своих предшественников, этим соединениям посвящены отдельные разделы. Меротерпены, в том числе терпеновые алкалоиды, в данной главе не рассматриваются.

При написании этой главы источниками информации нам служили главным образом работы, опубликованные после 1975 г. В силу ограниченного объема главы в нее оказалось невозможным включить значительную часть сведений, содержащихся в аналогичной главе предыдущего издания книги. Из числа более ранних работ цитируются преимущественно такие, в которых предложены широко используемые в настоящее время методы или содержатся полезные табличные данные. Число публикаций, посвященных хроматографии терпенов, столь велико, что их невозможно сколько-нибудь полно осветить в рамках одной главы, поэтому мы ограничились описанием общих методов и конкретных примеров их применения, уделив особое внимание аналитической и препаративной ВЭЖХ, получившей в последние годы очень широкое распространение в качестве метода анализа терпенов и других природных соединений [1—4]. Поскольку в большинстве случаев методы разделения терпенов имеют непосредственное отношение к биологии (например, методы определения терпеновых соединений в биологических жидкостях и тканях и методы очистки терпенов при изучении их метаболизма), в данной главе отдано предпочтение вопросам использования хроматографии именно в этой области исследований. Информацию общего характера о хроматографии терпенов можно найти в предыдущих изданиях этой книги, а также в справочнике [5].

5.2. Гемитерпены, мевалоновая кислота и родственные соединения

С задачей хроматографического выделения мевалоновой кислоты или ее лактона часто сталкиваются при получении изотопно меченных субстратов, необходимых для изучения биосинтеза изопrenoидов [6], а также при обнаружении и определении активности 3-окси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы — ключевого регуляторного фермента в цепи метаболических превращений изопrenoидов [7]. Методика определения активности этого фермента включает стадию отделения продукта реакции от субстрата, т. е. стадию отделения мевалоновой кислоты (в виде ее лактона) от 3-окси-3-метилглутарил-КоА. Для этого предложено несколько простых вариантов метода ТСХ, в том числе разделение на силикагеле в системе ацетон — бензол (1 : 1) и в других растворителях [7—11] на суперсел- CaSO_4 (3 : 1) [12] и на целлюлозе [8]. Поскольку большое количество солей, присутствующих в анализируемых смесях, мешает разделению, в некоторых методиках предусмотрена предварительная экстракция лактона мевалоновой кислоты и 3-окси-3-метилглутарил-КоА

эфиром [8, 13], однако в этом случае для оценки количества веществ в исходную смесь необходимо добавлять внутренние стандарты [14, 15]. Иногда экстракцию не проводят, а просто освобождаются от белков и полученный раствор непосредственно наносят на адсорбент [9, 16]. Разработан также простой одностадийный метод выделения лактона мевалоновой кислоты, основанный на селективной экстракции этого соединения бензолом [7]. Другой быстрый метод отделения лактона мевалоновой кислоты от 3-окси-3-метилглутарил-КоА заключается в том, что смесь наносят на фильтровальную бумагу и проводят восходящее элюирование толуолом [17].

К числу быстрых методов обнаружения и количественного определения мевалоновой кислоты и ее изотопно меченных аналогов относится также ГЖХ на различных полиэфирных неподвижных фазах [18]. Мевалоновую кислоту можно хроматографировать либо в виде ее лактона [19], либо в виде метилового эфира [20] или триметилсилильного производного [21]. Следует, однако, отметить, что в условиях ГЖХ метилмевалонат подвержен гидролизу [22].

Очищают изотопно меченные мевалонаты методом колоночной хроматографии на целите — H_2SO_4 в хлороформе [6, 10], столь же эффективна в данном случае и ионообменная хроматография на дауксе-1 [23—25]. Поскольку часто бывает необходимо отделить мевалоновую кислоту от неионных веществ или ее лактон от заряженных молекул, методы ионного обмена, по-видимому, получают широкое распространение. Мевалоновая кислота легко превращается в лактон при нагревании в 0,1 М HCl при 37°C в течение 30 мин [26], однако эта реакция может сопровождаться дегидратацией, в результате которой образуется побочный продукт — лактон Δ^2 -3-дезоксимевалоновой кислоты [27]. Чистоту мевалоновой кислоты часто оценивают с помощью хроматографии на бумаге, в частности на бумаге ватман № 3 ММ в системе пропанол-1 — конц. NH_4OH — вода (6 : 3 : 1) [5, 17].

Гемитерпеновые спирты — изопентенол, 3-метилбутен-2-ол-1 и 2-метилбутен-3-ол-2 — можно легко разделить с помощью ТСХ на сорбентах, содержащих ионы серебра (например, на силикагеле G, содержащем 25% AgNO_3 , в этилацетате) [28], а также с помощью различных вариантов ГЖХ [29, 30]. Как в аналитических целях, так и в целях препаративного выделения этих спиртов, вероятно, пригодна колоночная хроматография низкого давления на силикагеле с привитыми октадецильными остатками [31]. Отделить гемитерпеновые спирты от их высших аналогов можно также, используя обращенно-фазовую ТСХ на силикагеле, пропитанном силиконовым или минеральным маслом [32, 33].

Изопрен (2-метилбутадиен-1,3) обнаружен среди летучих соединений, выделяемых различными высшими растениями [34, 35]. Это газообразное природное соединение, образующееся также при пиролизе натурального каучука [36], можно легко отделить от других изомеров C_5H_8 с помощью ГЖХ на тенаксе-ГС [37].

5.3. Монотерпены

5.3.1. Газо-жидкостная хроматография

Монотерпены являются летучими соединениями и поэтому вполне пригодны для анализа методом ГЖХ; разделение смесей монотерпенов, в частности эфирных масел сложного состава, этим методом хорошо отработано в настоящее время [38—44] и применяется в промышленном масштабе [45]. Наиболее перспективным методом разделения и идентификации монотерпенов является хроматомасс-спектрометрия, позволяющая в рамках одного эксперимента определить характеристики удерживания компонентов смеси и получить их масс-спектры, причем по чувствительности этот метод анализа существенно превосходит любой другой [46—48]. Использование ЭВМ для обработки данных газо-жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, а также для поиска соответствующей информации в банке литературных данных существенно ускорило процедуру идентификации монотерпенов, с которой приходится часто сталкиваться при хемосистематических исследованиях и при анализе смесей душистых веществ [49, 50]. К настоящему времени изучено большое количество эфирных масел, содержащих монотерпены, и во многих случаях определен их состав [46, 51, 52].

Монотерпены весьма склонны к разложению как в процессе выделения этих соединений, так и при последующем их хроматографическом исследовании, что необходимо учитывать при анализе результатов [38, 53, 54]*. Наиболее общим методом выделения летучих масел из биологических тканей является перегонка с водяным паром [38]. В тех же случаях, когда необходимо свести к минимуму возможность деструкции выделяемых соединений, лучше использовать экстракцию растворителями [54]. Следует, однако, отметить, что обработка растворителями (без последующей фракционной перегонки [54, 55]) дает, как правило, суммарный липидный экстракт, который перед анали-

* Влияние твердого носителя на аналогичные характеристики хроматографической методики систематически рассмотрено в книге: Березкин В. Г., Пахомов В. П., Сакодынский К. И. Твердые носители в газовой хроматографии. — М.: Химия, 1975. — Прим. ред.

зом методом ГЖХ необходимо очистить, например, с помощью колоночной хроматографии, ТСХ и т. п. Разработаны различные приспособления, позволяющие вообще исключить стадию предварительного выделения монотерпенов [38, 56—58]. Например, анализируемый образец (обычно растительной ткани) вводят непосредственно в нагретый инжектор хроматографа, где собственно и происходит испарение всех летучих компонентов. Такая методика особенно полезна при проведении анализов большого числа образцов, однако в силу того, что сам метод накладывает определенные ограничения на количество используемого препарата, результаты анализа не всегда достаточно информативны.

При проведении анализа монотерпенов методом ГЖХ может возникнуть ряд различных проблем, в частности в инжекторе [38, 39], на твердом носителе [39, 59] или в жидкой фазе могут происходить изомеризация, дегидратация и полимеризация этих соединений. Например, силиконовое масло способствует разложению сабинена [60], а спиртово-аминные фазы могут индуцировать енолизацию изоментона [61]. Вероятность разложения соединений, искажающего результаты анализа, можно существенно уменьшить, если снизить температуру инжектора до минимально необходимой для полного испарения образца, а также если использовать полностью стеклянную систему, вводить образец непосредственно в колонку и применять силанизированные твердые носители. Такие меры предосторожности в этой области исследований считаются почти стандартными [38, 39]. При аналитической работе разложение образцов в пламенно-ионизационном детекторе или в детекторе по теплопроводности редко вызывает беспокойство, однако при препаративном разделении веществ их деструкция в ячейке теплопроводности может оказаться серьезной проблемой [62].

Среди множества полярных и неполярных неподвижных фаз, используемых для разделения монотерпенов, наиболее универсальными являются, по-видимому, карбоваксы (полиэтиленгликоли) [38, 39, 42] (табл. 5.1). Для идентификации монотерпенов обычно достаточно сравнить относительные характеристики их удерживания на двух или большем числе сорбентов различной полярности, и поэтому анализ смесей на карбоваксе часто проводят одновременно с анализом на неполярной фазе, например, апиезоне (парафиновая смазка) или силиконовом масле [38, 39, 60, 63—69] (табл. 5.1). Альтернативный подход к анализу соединений одного и того же класса заключается в определении хроматографических характеристик серии их производных, например триметилсилильных производных и ацетатов монотерпеновых спиртов [70]. В зависимости от конкретной задачи эксперимента весьма полезными могут оказаться и другие неподвижные

Таблица 5.1. Относительные объемы удерживания (V_R) монотерпенов на колонках 3 м×3,2 мм с 10% SE-30 (А) или карбовакса 20 М (Б) на газохроме Q, 100—200 меш, при скорости потока газа-носителя 35 мл/мин и температуре 130 °С (А) или 165 °С (Б)

Соединение	$(V_R/V_R^{\text{камфоры}}) \times 10^3$		Соединение	$(V_R/V_R^{\text{камфоры}}) \times 10^3$	
	колонка А	колонка Б		колонка А	колонка Б
α-Туйен	375	109	Изопинокамфон	1126	1073
Трициклен	392	104	Борнеол	1126	1490
α-Пинен	404	111	Ментол	1143	1173
Камфен	434	148	Изопинокамфеол	1182	1561
α-Фенхен	443	147	Терпинен-4-ол	1184	1111
Сабинен	460 ^а	197	Миртеналь	1224	1331
β-Пинен	465	188	Неоизоментол	1224	1161
Мирцен	490	242	транс-Дигидрокар- вон	1241	1223
α-Фелландрен	530	251	цис-Дигидрокар- вон	1286	1341
Δ ³ -Карен	551	233	Неодигидрокар- веол	—	1527
α-Терпинен	559	272	Дигидрокарвеол	1249	1663
n-Цимен	563	448	Изодигидрокар- веол	—	1837
цис-Оцимен	567	350	Неоизодигидрокар- веол	—	1999
Лимонен	597	303	Изоментол	1241	1279
транс-Оцимен	602	391	α-Терпинеол	1241	1415
1,8-Цинеол	605	402	Миртенол	1278	1945
γ-Терпинен	673	422	транс-Вербенол	1310	1701
транс-Сабиненгид- рат	694	695	транс-Пиперитол	1318	1626
Фенхон	763	691	транс-Карвеол	1392	2148
Линалоол	767	807	Цитронеллол	1428	1614
Терпинолен	775	484	Нерол	1441	1868
цис-Сабиненгидрат	808	894	цис-Карвеол	1453	2384
3-Изотуйон	833	720	Нераль	1486	1409
3-Туйон	869	757	Пулегон	1526	1392
Фенхол	882	1007	Карвон	1531	1775
3-Туйянол	939	1229	Гераниол	1608	2138
Цитронеллаль	967	747	Пиперитон	1628	1788
Камфора	1000	1000	Гераниаль	1690	1630
3-Неотуйянол	1004	1160	Тимол	1886	6673
3-Изотуйянол	1004	1291	Карвакрол	1967	7114
Ментон	1030	819	n-Мент-1-ен-9-ол	2016	3103
Изоментон	1085	888	n-Цимен-7-ол	2265	5214
Изоборнеол	1089	1359	Пиперитенон	2437	3267
3-Неоизотуйянол	1093	1390			
Ментофуран	1102	844			
Умбеллулон	1102	1318			
Неоментол	1122	1043			

^а Сабинен в этих условиях не разлагается.

фазы [39], в том числе нитрилы [60], ароматические простые полиэфиры [71, 72] и сложные полиэфиры [73—76]. Описано более шестидесяти жидких фаз, пригодных для анализа монотерпенов [77]. В частности, автор работы [39], чтобы достичь разделения очень близких по своим хроматографическим свойствам пар монотерпенов, использовал смешанные жидкие фазы. Среди неподвижных фаз, сравнительно недавно вошедших в аналитическую практику, можно отметить тенакс-ГС [78] и графитированную ламповую сажу [79]. Гидрирование образца в инжекторе [80] и программирование давления [81] являются полезными вспомогательными приемами, дополняющими классический анализ монотерпенов методом ГЖХ.

Для препаративного выделения монотерпенов предпочтительны полностью стеклянные системы. Поскольку анализируемые вещества могут разлагаться в катарометре препаративного хроматографа, мы используем стеклянный делитель потока элюата, который позволяет направить в детектор (в нашем случае пламенно-ионизационный) лишь часть элюата (2—5%). Как выяснилось, по своим возможностям такая система обнаружения значительно превосходит детектор по теплопроводности. В сущности любые неподвижные фазы и твердые носители, применяемые в аналитической практике, пригодны и для препаративной работы. Достаточно лишь увеличить диаметр колонки и использовать носители с несколько большим размером частиц (30—80 меш вместо 80—100 меш). Чтобы в автоматическом режиме работы обеспечить четкую воспроизводимость результатов, разделение проводят, как правило, в изотермических условиях. Поэтому часто желательно провести предварительно фракционирование образца в соответствии с температурами кипения или химическими свойствами его компонентов (например, отделить непредельные монотерпены от непредельных сесквитерпенов или олефины от спиртов). Чтобы осуществить такое предварительное фракционирование, являющееся полезной процедурой и при аналитических исследованиях, можно провести разделение методом колоночной хроматографии или фракционную перегонку или же получить легкоразделимые производные, которые несложно регенерировать до исходных соединений (например, терпеновые спирты превращают в 2,4-динитробензоаты, которые после отделения от других компонентов гидролизуют) [82—88].

Очень мощным инструментом исследования биохимических превращений меченых соединений, в частности терпенов, оказалась система, в рамках которой объединены хроматограф и счетчик радиоактивности [89—92]. Совпадение пика радиоактивности с хроматографическим пиком, отвечающим определенному терпену, можно рассматривать как указание на идентичность меченого и немеченого соединений, однако такая идентифика-

ция, часто весьма полезная при предварительных исследованиях или проведении рутинных анализов, должна быть подтверждена независимым методом, лучше всего путем получения соответствующих производных и их перекристаллизации до постоянной удельной активности [93, 94]. Известны также методики ферментативного анализа, основанные на использовании ГЖХ и немеченых субстратов, причем в этом случае идентификацию соединений проводят с помощью масс-спектрометрии [95].

Как показали исследования, ГЖХ особенно полезна при разделении изомерных монотерпенов [61, 96—100] и, следовательно, имеет большое значение при проведении стереохимического анализа [100—102]. В частности, на колонке с гликолевой неподвижной фазой, содержащей 30% AgNO_3 , удалось разделить шесть позиционных изомеров *n*-ментена [100], а на колонке с карбоваксом 400 — четыре диастереомерных ментола [61]*. Изомеры ментола можно также разделить в виде их триметилсилильных производных на SE-30 [103]. Газохроматографическое разделение рацематов проводят после их предварительного превращения в диастереомеры. Так, например, (\pm) -ментон можно разделить на оптические антиподы в виде производного $(+)$ -винной кислоты [104], (\pm) -метанол и (\pm) -борнеол — в виде их ацетил-D-глюкозидов [105], а (\pm) -камфору — в виде кетала D-(—)бутандиола-2,3 [106, 107]. Другой подход к получению диастереомеров заключается в использовании оптически активных неподвижных фаз [108]. Описано также разделение рацематов на обычных неподвижных фазах [109]. Суть этого метода сводится к тому, что одновременно с рацематом в колонку вводят летучий асимметрический реагент.

Поскольку основной задачей хроматографии монотерпенов является разделение очень сложных смесей на индивидуальные компоненты, во многих областях исследований обычные насадочные колонки быстро вытесняются более эффективными открытыми капиллярными колонками с непористым (ОНС) или пористым (ОПС) слоем [66, 69, 110—115]. ОНС-колонки очень легко перегрузить — значительно легче, чем ОПС-колонки, поэтому при работе с колонками первого типа необходимо использовать специальные дозирующие устройства для ввода образца. В старых моделях таких инжекторов высоко- и низкокипящие терпены могли разделяться. Современные впускные устройства практически лишены этого недостатка, для них характерны весьма разнообразные режимы дозирования и ввода образцов.

* Недавно предложено использовать в качестве неподвижных жидких фаз расплавы (растворы) кристаллогидратов, в которых может быть растворен и нитрат серебра (Березкин В. Г., Викторова Е. Н. — ДАН СССР, 1983, 271, с. 1412). Неподвижные фазы этого типа, по-видимому, целесообразно применять и для разделения терпенов. — *Прим. ред.*

Когда появятся в продаже кварцевые капиллярные колонки, имеющие различную длину и разнообразные покрытия [116, 117], капиллярная газовая хроматография, вероятно, займет ведущее положение среди аналитических методов. Фракционирование смесей монотерпенов проводится на колонках длиной вплоть до 300 м [118], однако во многих случаях вполне приемлемое разделение обеспечивают более короткие колонки [119].

5.3.2. Тонкослойная хроматография

ТСХ обычно используют для полупрепаративного разделения смесей монотерпенов перед их газо-жидкостным хроматографическим анализом [120—122], для быстрого качественного анализа эфирных масел [44, 123—125], в качестве средства контроля за ходом реакций или разделения веществ методом жидкостной хроматографии [126, 127], а также в качестве метода анализа изотопно меченных соединений [128—130]. В последнем случае к смеси добавляют внутренние стандарты, чтобы свести к минимуму возможность потери меченых монотерпенов вследствие их испарения. Вопросы, касающиеся сочетания ТСХ с другими хроматографическими методами, подробно обсуждаются в работе [131].

Среди множества адсорбентов, используемых для ТСХ монотерпенов, наиболее универсальным является силикагель. Кислородсодержащие монотерпены обычно хроматографируют в системах гексан—этилацетат [132], если же анализируются монотерпеновые углеводороды, то в присутствии даже небольшого количества этилацетата все компоненты элюируются в виде одной зоны. Недостаток силикагеля как адсорбента заключается в том, что разделение монотерпенов может сопровождаться образованием побочных продуктов [133, 134], так, например, α -терпинен может окисляться до n -цимена, а сабинен может изомеризоваться с образованием смеси α -туйена и n -ментадиенов. Вероятность такого рода превращений можно существенно уменьшить, если при приготовлении геля вместо воды использовать разбавленные растворы щелочей или если провести предварительное элюирование пластинок с целью удаления примесей и дезактивации каталитических центров адсорбента. В некоторых случаях силикагель дезактивируют полиэтиленгликолем [135]. Часто более высокого разрешения можно достичь путем хроматографирования монотерпеновых спиртов в виде их триметилсилильных производных, ацетатов или динитробензоатов [136—138]. ТСХ весьма полезна при конформационном анализе монотерпеновых спиртов и кетонов [102, 139]. Этот метод был недавно использован для разделения оптических антиподов ок-

сима (\pm)-фенхона через диастереомерные ($-$)-метилоксиметилловые эфиры [140].

Хорошим методом разделения моноциклических и особенно алифатических терпенов является ТСХ на силикагеле, пропитанном нитратом серебра [141]. Так, например, с помощью хроматографии на силикагеле, пропитанном 6—8%-ным раствором нитрата серебра, в гексане или бензоле можно отделить сабинен от β -пинена и α -туйен от α -пинена [136, 142], а в системе эфир — циклогексан (1:99) можно отделить γ -терпинен от α -терпинена, а α -терпинен от лимонена [142]. В более полярных растворителях легко поддаются разделению *цис* — *транс*-изомеры монотерпеновых спиртов [28, 137]. В связи с тем что пластинки, содержащие нитрат серебра, светочувствительны и имеют ограниченный срок хранения, были предприняты попытки заменить ионы серебра на ионы других металлов, также способных образовывать π -комплексы с ненасыщенными соединениями [143, 144], однако предложенные методики обладают незначительными преимуществами. Обращенно-фазовая ТСХ, применяемая главным образом для разделения терпенов с различной длиной цепи [145], была использована для разделения монотерпеновых спиртов [132].

Для обнаружения монотерпенов и их высших аналогов на тонкослойных пластинках применяют разнообразные реагенты, в том числе иод, концентрированную серную кислоту, раствор ванилина в серной кислоте, фосфомолибденовую и фосфовольфрамовую кислоты, а также хлориды олова, мышьяка и сурьмы [146—148]. Кроме того, с помощью соответствующих реакций можно непосредственно на пластинке получать окрашенные производные анализируемых соединений как до начала элюирования [126], так и по окончании элюирования (например, превращать оксоединения в динитрофенилгидразоны) [123]. В настоящее время разработан ряд методов обнаружения терпенов, не приводящих к разложению терпенов [149, 150]. Наибольшее распространение получило использование флуоресцентных красителей, таких, как дихлорфлуоресцеин и родамин. Циклические и некоторые кислородсодержащие монотерпены тушат индуцированную УФ-облучением флуоресценцию, что позволяет отличить их от других соединений. Большинство монотерпенов можно смыть с силикагеля сухим диэтиловым эфиром, при этом флуоресцентный краситель остается связанным с носителем.

5.3.3. Колоночная хроматография

Хотя колоночная хроматография широко используется при разделении терпенов [151], применимость данного метода для разделения монотерпенов ограничена из-за их летучести и, сле-

довательно, возможности потери вещества при концентрировании элюатов. Тем не менее препаративной колоночной хроматографией, как правило, широко пользуются для фракционирования препаратов эфирных масел перед их анализом методом ГЖХ [82—88]. Углеводороды хроматографируют на силикагеле или оксиде алюминия, элюируя их пентаном или гексаном, а для разделения кислородсодержащих монотерпенов на отдельные классы (эфиры, кетоны, спирты и т. п.) применяют ступенчатое элюирование пентаном, содержащим различное количество дихлорметана или диэтилового эфира. С помощью колоночной хроматографии на оксиде алюминия, содержащем нитрат серебра, осуществлено фракционирование монотерпенов [81, 152].

ВЭЖХ, как и обычная колоночная хроматография, была использована для предварительного фракционирования эфирных масел перед их анализом методом ГЖХ [153], а в отдельных случаях и для препаративного и полупрепаративного выделения веществ [154, 155]. До сих пор область аналитического применения этого метода ограничена монотерпенами, содержащими хромофорные группы, т. е. такими соединениями, которые можно обнаруживать УФ-детекторами [156—160]. Наиболее многообещающей областью использования ВЭЖХ является, вероятно, разделение термолабильных терпенов, с трудом поддающихся анализу с помощью ГЖХ. Описано разделение смесей монотерпенов на силикагеле [156, 159], на силикагеле с привитыми октадецильными остатками [157, 159], а также на некоторых сорбентах, используемых в гель-хроматографии [157, 158]. В работе [161] описано разделение алифатических терпенов на силикагеле, покрытом нитратом таллия [161]. Нитрат таллия менее растворим, чем нитрат серебра, что позволяет проводить разделение в более полярных растворителях. С помощью ВЭЖХ на мелкозернистом силикагеле было осуществлено разделение ряда монотерпеновых кислот в виде их (+)-1-(1-нафтил)этиламидов [162]. Этот метод разделения представляется весьма перспективным, поскольку диастереомеры монотерпенов имеют сравнительно высокую молекулярную массу и поэтому могут оказаться непригодными для анализа методом ГЖХ.

5.4. Сесквитерпены

Многие из вышеописанных методов разделения монотерпенов в равной степени применимы и к сесквитерпенам, поскольку хроматографические свойства этих двух классов соединений, за исключением очевидных различий диапазонов температур кипения, весьма сходны [39, 40]. Поскольку эфирные мас-

Таблица 5.2. Характеристики удерживания (модифицированные индексы Ковача) сесквитерпенов на колонках с апиезоном L (А) и карбоваксом 20 М (Б)^а

	Индекс		Соединение	Индекс	
	колонка А, 155 °С	колонка Б, 165 °С		колонка А, 155 °С	колонка Б, 165 °С
Кубебен	1368	—	δ-Селинен	1504,9	1728,5
α-Иланген	1401,5	1538,5	γ-Мууролен	1505,7	1725
β-Элемен	1410	—	γ-Аморфен	1506,4	1724
α-Боурбонен	1410	—	α-Химачален	1508	1704,5
α-Копаен	1410,2	1551,3	α-Аморфен	1509,5	1724,5
Циклосативен	1411,9	1549	Цизаен	1511,6	1706,3
Лонгициклен	1417,1	1554	β-Бисаболен	1512,9	1745,5
Циклокопакамфен	2417,8	1555,4	β-Куркумен	1513,6	1756
β-Боурбонен	1418,3	1586,5	α-Цингаберен	—	1738
β-Фарнезен	1429,2	1668	Валенцен	1525,6	1760
Сативен	1434,7	1594,5	β-Химачален	1529,7	1752,5
Куперен	1446,6	1606	β-Селинен	1530,2	1766,5
Кариофиллен	1451,7	1655,5	γ-Бисаболен	1531,3	1765,5
Лонгифолен	1464	1643	α-Мууролен	1531,3	1725,5
Изосативен	1464,4	1639	α-Пироветивен	1533,9	1817
Каларен	1466	1655,5	α-Селинен	1534,5	—
α-Цедрен	1473,4	1640	ε-Булгарен	1533	—
Туйопсен	1476,1	1684,2	δ-Кадинен	1546,4	1784
γ-Куркумен	1481,9	—	γ-Кадинен	1554,9	1792,3
β-Цедрен	1482,4	1670	Селина-4 (14), 7 (11)-диен	1572	1816,3
α-Куркумен	1483	1787,5	Селина-3,7 (11)-диен	1580	—
ε-Мууролен	1484,8	1713,8	β-Ветивенен	1583	1885
Хумулен	1487,2	1719			
Селина-4 (14), 7-диен	1491,9	1694			

^а Таблица воспроизведена из работы [175] с разрешения авторов. Подробное описание экспериментальных условий, а также значения индексов, полученные при разделении указанных соединений на других жидких фазах, см. в оригинале.

ла наряду с монотерпенами содержат, как правило, и сесквитерпены, анализировать их приходится вместе. Как и монотерпены, сесквитерпены весьма склонны к перегруппировкам, катализируемым нагреванием и действием кислот [163—167], что осложняет их выделение [168, 169] и анализ, в частности разделение методом ГЖХ. В силу того что природных сесквитерпенов известно значительно больше, чем монотерпенов, причем существует множество групп родственных геометрических изомеров и стереоизомеров, задача разделения и идентификации относится к числу весьма трудных.

5.4.1. Газо-жидкостная хроматография

Физические свойства сесквитерпеновых углеводов идеально соответствуют требуемым для разделения и выделения методом ГЖХ. Впрочем, анализ сложных смесей терпенов не лишен и трудностей, связанных с вышеупомянутой возможностью их разложения, а также с тем, что на большинстве колонок диапазоны времени удерживания сесквитерпенов и кислородсодержащих монотерпенов перекрываются [38, 39, 82]. Успешное разделение ациклических, моноциклических, бициклических и трициклических сесквитерпеновых углеводов было осуществлено на весьма разнообразных полярных и неполярных жидких фазах [170—174], и на основании полученных результатов была составлена [175] обширная таблица характеристик удерживания этих соединений (табл. 5.2). Сравнительно меньше внимания исследователи уделяют газо-жидкостной хроматографии кислородсодержащих сесквитерпенов [39], хотя этот метод и оказался вполне пригодным для разделения, например, сесквитерпенов, принадлежащих к группе элемола и эвдесмола [39], трикотекановых митотоксинов и их триметилсилильных производных [176], фураносесквитерпенов [177—180], а также соединений, относящихся к некоторым другим структурным типам [181, 182]. На колонках с полиэфирной неподвижной фазой и с силиконовым маслом были разделены разнообразные геометрические изомеры фарнезола [183] и ювенильного гормона [184]. ГЖХ (в сочетании с использованием пламенно-ионизационного детектора или детектора по захвату электронов) лежит в основе различных методов определения абсцизовой кислоты [185—188].

Очень полезным дополнением к методу ГЖХ сесквитерпенов является разделение этих соединений в виде продуктов их дегидрирования [189, 190] или гидрирования [175, 191] (соответствующие реакции могут быть проведены непосредственно в инжекторе газового хроматографа). Введение в практику исследований хроматомасс-спектрометрии существенно расшири-

ло возможности хроматографического анализа сесквитерпенов [192—195], и в настоящее время этот метод широко используется для определения абсцизовой кислоты и ее метаболитов [196—201]. Система, объединяющая газовый хроматограф и счетчик радиоактивности, нашла применение при изучении биосинтеза изомерных фарнезолов [202].

5.4.2. Тонкослойная и колоночная хроматография

Силикагель является наиболее широко используемым адсорбентом для тонкослойной и колоночной хроматографии сесквитерпенов. Последний метод применяется в основном для отделения сесквитерпеновых углеводов от кислородсодержащих соединений (например, от кислородсодержащих монотерпенов), которые мешают последующему газо-жидкостному хроматографическому анализу [192, 194, 203, 204]. На силикагеле проводилось также хроматографирование кислородсодержащих сесквитерпенов, в том числе спиртов [205—208], кетонов и альдегидов [209, 210], различных лактонов [211—215], соединений с фурановым циклом [179, 193, 216] и абсцизовой кислоты [187, 188]. Смеси сесквитерпеновых углеводов были разделены с помощью тонкослойной [172, 217] и колоночной [172, 218] хроматографии на силикагеле, пропитанном раствором серебра. Эта методика применима и для разделения изомерных сесквитерпеновых спиртов [28]. Сесквитерпены нескольких типов можно анализировать методом адсорбционной хроматографии на колонках с оксидом алюминия (как в присутствии, так и в отсутствие нитрата серебра) [178, 219, 220], а для разделения полярных производных, таких, как лактоны кислот, в состав молекул которых входит несколько кислородсодержащих функциональных групп, более эффективной является распределительная колоночная хроматография (например, на целлюлозе) [221, 222].

ВЭЖХ на силикагеле была использована для разделения сесквитерпеновых лактонов [223, 224], фураносесквитерпенов [225] и изомеров сесквитерпеновых спиртов [226—228]. Многообещающим методом разделения геометрических изомеров является хроматография на ионообменных смолах в Ag^+ -форме [229] и на силикагеле, содержащем нитрат серебра [230]. Гель-хроматография позволяет разделить ациклические, бициклические и трициклические сесквитерпеновые углеводороды и спирты в соответствии с размерами их молекул [158]. Сесквитерпеновые спирты можно легко отделить от терпеновых спиртов других классов с помощью обращенно-фазовой колоночной хроматографии низкого давления на силикагеле с привитыми октадецильными остатками [31]. ВЭЖХ (обычная распределительная)

тельная, обращенно-фазовая и ионообменная) составляет основу ряда чувствительных методов быстрого определения абсциссовой кислоты [185, 231—235].

5.5. Дитерпены

5.5.1. Газо-жидкостная хроматография

Со времени опубликования работ (в том числе работы Эглинтон и др. [236]), продемонстрировавших пригодность ГЖХ для анализа дитерпеновых соединений, этот метод нашел широкое применение в данной области. С помощью ГЖХ можно легко разделить ациклические дитерпеновые углеводороды [237, 238], циклические олефины типа лабдана [239], пимарана [172, 240], абиатана [241—243] и каурана [244], а также ациклические дитерпеновые кислоты (к их числу относятся фитановая кислота и ее производные) [245, 246] и различные смоляные кислоты (их обычно анализируют в виде метиловых или триметилсилиловых эфиров) [247—251]. Характеристики удерживания метиловых и триметилсилиловых эфиров смоляных кислот приведены в работах [250—253]. Изучена также возможность анализа этих кислот методом ГЖХ в виде других сложных эфиров [254]. Весьма близкие по своим хроматографическим свойствам левопимаровую и палустровую кислоты удалось разделить в виде их метиловых или *трет*-бутиловых эфиров на колонке с циансиликоном. В работах [238, 240, 255] описано разделение незащищенных дитерпеновых спиртов, однако часто лучше их предварительно перевести в ацетаты или триметилсилильные производные [238, 251]. Разделение дитерпеноидов проводят, как правило, на насадочных колонках с низкой степенью загрузки неполярной (апиезон L, SE-30) или полярной (полиэфир) жидкой фазой, чтобы можно было снизить рабочую температуру и таким образом свести к минимуму возможность изомеризации [38], причем твердый носитель должен быть полностью дезактивирован (например, силанизацией), в противном случае изомеризация все равно неизбежна [250, 256]. Дитерпены склонны также к разложению во время перегонки [257]. Сравнительно недавно для анализа дитерпеновых углеводородов и кислот были использованы методы капиллярной ГЖХ (как на полярных, так и на неполярных фазах) и хроматомасс-спектрометрии [238, 245, 246, 257—261].

В связи с тем что число обнаруженных природных гиббереллинов продолжает возрастать (в настоящее время известно около 50 таких соединений [262]), возникает необходимость во все более и более совершенных аналитических методах разделения, идентификации и количественного определения этих ди-

терпеновых стимуляторов роста растений [263]. Применение газовой хроматографии и хроматомасс-спектрометрии для анализа гиббереллинов рассматривается в превосходном обзоре Гаскина и Макмиллана [264]. Очень чувствительный метод анализа гиббереллинов в виде их трифторацетатов основан на использовании ГЖХ и детектора по захвату электронов (предел обнаружения составляет несколько нанограммов) [265]. Газо-жидкостная радиохроматография нашла широкое применение при изучении метаболизма гиббереллинов [266—268].

5.5.2. Тонкослойная хроматография

ТСХ на силикагеле, оксиде алюминия и кизельгуре широко используется для предварительного фракционирования кислородсодержащих дитерпенов при проведении их структурных исследований и изучении биосинтеза этих соединений. Описаны методики разделения смоляных кислот [269, 270], эфиров геранилгераниевой кислоты [271], дитерпеновых спиртов [272—275] и дитерпеноидов с большим числом кислородсодержащих функциональных групп [276—279]. С помощью ТСХ на силикагеле можно легко разделить смесь предшественников гиббереллина — каурена, кауренола, кауреналя и кауреновой кислоты [280].

Дитерпеновые углеводороды являются особенно подходящими объектами для разделения методом ТСХ на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра. Согласно методике, предложенной Робинсоном и Вестом [281], смесь хроматографируют на комбинированных силикагелевых пластинках, частично пропитанных нитратом серебра. Образцы наносят на слой, не содержащий нитрата серебра, и элюируют смесью гексан — бензол (7:3). При этом полярные соединения остаются на старте, макроциклический дитерпен казбен задерживается на границе раздела двух слоев, а другие полициклические дитерпеновые углеводороды (сандаракопимарадиен, каурен, биурен, трахилобан) с различной скоростью мигрируют в слое, содержащем нитрат серебра. Методом ТСХ на сорбентах, содержащих соли серебра, можно также разделить ациклические дитерпены [238], дитерпеновые спирты [33] и кислоты [282]. Обращенно-фазовая ТСХ позволяет отделить дитерпеноиды от других аналогов изопрена, имеющих более длинную или более короткую углеводородную цепь [32, 33].

ТСХ является важным аналитическим методом изучения гиббереллинов, отличающимся высокой скоростью и чувствительностью (предел обнаружения составляет 0,1 мкг). В этой области исследований находит применение как адсорбционная [283, 284], так и распределительная [283, 285, 286] хроматогра-

фия, причем часто эти методы используют в сочетании с анализом изотопно меченных соединений [287]. Пары гиббереллинов, молекулы которых различаются лишь наличием или отсутствием двойной связи, удалось разделить в виде их *n*-нитробензиловых эфиров на сорбенте, пропитанном раствором соли серебра [288]. Эта очень чувствительная методика (предел обнаружения составляет 10 нг) пригодна для разделения таких близких по своим хроматографическим свойствам пар гиббереллинов, как $\text{GA}_4\text{—GA}_7$, $\text{GA}_1\text{—GA}_3$ и $\text{GA}_5\text{—GA}_{20}$.

5.5.3. Колоночная хроматография

Колоночная хроматография на силикагеле или оксиде алюминия составляет основу стандартной процедуры очистки практически всех типов дитерпеноидов [274, 275, 279, 281, 289—294]. Хроматография на колонках с силикагелем, пропитанным раствором нитрата серебра, и хроматография в режиме градиентного элюирования являются эффективными методами фракционирования кислородсодержащих дитерпенов [295, 296] и дитерпеновых углеводов [281]. Описана также ионообменная хроматография смоляных кислот [297], представляющая собой удобный метод их отделения от родственных природных соединений, которые могут мешать газо-жидкостному хроматографическому анализу метиловых эфиров этих кислот. Обращенно-фазовая ВЭЖХ была использована для разделения дитерпеноидов с большим числом атомов кислорода в молекуле [298—300].

Для предварительной очистки гиббереллинов пригодны различные варианты колоночной хроматографии, в том числе хроматография на смеси древесного угля и целита [301] или на винилпирролидоне [302], гель-хроматография [303], ионообменная хроматография [304], а также адсорбционная [305] и распределительная [306] хроматография на кремниевой кислоте. ВЭЖХ является эффективным методом разделения растительных гормонов [307—309], особенно удобным для анализа как самих гиббереллинов, так и их производных. В основе очень удобного метода разделения родственных гиббереллинов, различающихся степенью насыщенности, лежит ВЭЖХ их *n*-нитробензиловых эфиров [310]. Эти производные имеют достаточно высокий коэффициент молярного поглощения, что облегчает их обнаружение. Высокими коэффициентами молярного поглощения обладают также *n*-бромфенацилпроизводные и бензиловые эфиры гиббереллинов; первые можно разделить методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [311], вторые — на силикагеле [312]. Разделение незащищенных гиббереллинов было проведено на колонках с силикагелем [312] и с обращенными фазами [313].

Система ВЭЖХ в сочетании с проточным счетчиком радиоактивности позволяет проводить анализ меченых гиббереллинов [314]. Методики аналитической и препаративной ВЭЖХ гиббереллинов подробно обсуждаются в обзоре [312].

5.6. Сестеротерпены

Сестеротерпены — группа соединений, молекулы которых построены из пяти изопреноидных звеньев, — сравнительно недавно дополнили семейство терпенов. В исследовательской работе редко приходится сталкиваться с этими соединениями, в молекулах которых содержится 25 атомов углерода, хотя несколько их типичных представителей встречаются в биологических объектах (например, в высших и низших растениях, а также в насекомых). Существует по меньшей мере шесть различных структурных типов сестеротерпенов и множество производных, в том числе с большим числом атомов кислорода. Отсутствие каких-либо систематических попыток определить, насколько широко распространены сестеротерпены в природе, отчасти обусловлено разнообразием хроматографических свойств этих соединений. Все, что известно к настоящему времени о хроматографических свойствах сестеротерпенов, описано в общем обзоре [315, 316], посвященном этому классу терпенов. Для разделения сестеротерпенов пригодны, как правило, те же методы адсорбционной и распределительной хроматографии, которые используются и для разделения ди- и тритерпенов.

5.7. Тритерпены

5.7.1. Газо-жидкостная хроматография

Методика анализа тритерпенов с помощью ГЖХ в настоящее время достаточно отработана; она аналогична используемой для разделения очень похожих на них соединений группы стероидов (гл. 6). Икекава [317] свел в таблицу характеристики удерживания многочисленных тритерпенов (в том числе некоторых сапогенинов) на SE-30 и оценил влияние различных заместителей на эти характеристики. Для того чтобы улучшить разделение и уменьшить вероятность термического разложения полярных тритерпенов в процессе хроматографирования, их обычно анализируют в виде производных. Как и родственные дитерпены, тритерпеновые кислоты анализируют в виде метиловых эфиров, а спирты (особенно полиспирты) — в виде триметилсилильных производных или эфиров низших карбоновых кислот (уксусной, масляной и т. п.) [317—321]. Для разделения сложных эфиров тритерпеновых спиртов и высших жирных кис-

лот были использованы неподвижные фазы на основе силиконового масла [321]. Незащищенные тритерпеновые монооксисоединения хроматографировали как на неполярном силиконовом масле, так и на полярных полиэфирных фазах [317, 318, 322, 323]. Метод ГЖХ широко использовали при разделении тритерпенов, извлекаемых из нефти и других геологических объектов [324, 325]. Способность высокоселективных силиконовых фаз «распознавать» очень тонкие структурные различия тритерпенов [323, 326] позволяет предположить, что ГЖХ может служить методом стереохимического анализа этой группы соединений.

5.7.2. Тонкослойная хроматография

Лисбоа [327] определил значения хроматографической подвижности многих тетра- и пентациклических тритерпенов и тритерпеновых гликозидов на пластинках с силикагелем в различных системах растворителей, а авторы работы [328] свели в таблицу данные о подвижности около 30 тритерпенов в тонком слое оксида алюминия. С помощью ТСХ можно легко разделить соединения в соответствии с природой их функциональных групп. Этот метод пригоден также для разделения эпимерных тритерпеновых спиртов [328] и позволяет легко отделить сквален от соответствующих 2,3-оксида и 2,3-диола и от его предшественника — прескваленола [329, 333]. Полярные тритерпены разделяли либо непосредственно, элюируя полярными растворителями, либо предварительно переводили в менее полярные производные [331, 332].

Для разделения тритерпенов широко использовалась ТСХ на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра. С помощью этого метода были разделены смеси незащищенных тритерпеновых спиртов [333, 334], а также их ацетатов [329, 333], бензоатов [335] и триметилсилильных производных [336]. Этот метод полезен и при разделении тритерпенов и эфиров тритерпеновых кислот.

Важную роль в анализе тритерпенов играют реакции, осуществляемые непосредственно на хроматографической пластинке как до, так и после элюирования [327, 337], и специфические реагенты для опрыскивания хроматограмм [327, 338]. Полярные тритерпены, такие, как соя-сапогенол и кукурбитадины, были разделены на целлюлозе [338, 339].

5.7.3. Колоночная хроматография

Колоночная хроматография на силикагеле [333, 340, 341] или на оксиде алюминия [342] является одной из общепринятых стадий процесса выделения тритерпенов из смесей других липи-

дов и фракционирования тритерпенов различных классов. Этот метод, а также колоночная хроматография на сорбентах, содержащих соли серебра [343], были с успехом использованы для разделения практически всех типов тритерпенов, в том числе и сильнополярных [344, 345].

Недавно для разделения различных тритерпенов, включая кетоны, кислоты, моно- и полиспирты, была привлечена аналитическая и препаративная ВЭЖХ [346—352]. До сих пор в большинстве экспериментов использовали адсорбционную хроматографию, хотя смеси как полярных, так и неполярных соединений хорошо разделяются с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [350, 341]. ВЭЖХ является многообещающим методом разделения тритерпенов, особенно их полярных производных, таких, как лимониды [352] и соя-сапогенолы [349, 351], которые нелегко анализировать ГЖХ.

5.8. Тетратерпены

Высоконенасыщенные тетратерпены, обнаруженные в высших растениях, грибах, фотосинтезирующих бактериях и водорослях, обычно входят в состав сложных смесей фотосинтезирующих пигментов. Эти так называемые пигменты хлоропластов представляют собой интенсивно окрашенные соединения, что и послужило главной причиной их выбора в качестве объектов, на которых впервые был продемонстрирован принцип хроматографического разделения. Фракционирование терпенов этой группы проводилось на самых разнообразных сорбентах, в том числе и таких достаточно распространенных, как силикагель, оксид алюминия, карбонаты цинка и кальция, оксид магния, гидроксид кальция, целлюлоза и сахароза. Элюентами обычно служили смеси углеводов, содержащие более полярный растворитель, например диэтиловый эфир, ацетон, метанол или пропанол.

5.8.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Большие успехи достигнуты в области использования ВЭЖХ для разделения пигментов хлоропластов и других растительных пигментов (см. также ч. 2, гл. 10). Благодаря высокой скорости эксперимента и хорошей воспроизводимости результатов ВЭЖХ почти вытеснила другие методы хроматографии. При разделении на колонках с мелкодисперсным силикагелем [353] элюентом обычно служит гексан, содержащий пропанол-1 [354] или пропанол-2 [355]. С помощью хроматографии на колонке с μ -партисилиом 10 в системе легкий петролейный эфир — ацетон — диметилсульфоксид — диэтиламин (300:93:6:1) можно

разделить смесь β -каротина, феофитина и хлорофиллов *a* и *b*, а в системе легкий петролейный эфир — ацетон — метанол — диметилсульфоксид (30:40:27:3) можно отделить хлорофилл *c* от феофорбида *a* [356]. Силикагель использовали также для разделения пигментов хлоропластов, выделенных из мутантов табака. Разделение проводили методом высокоскоростной хроматографии низкого давления в системах, содержащих гептан, диэтиловый эфир и ацетон [357]. Согласно данным [357], такой вариант хроматографии является превосходным препаративным методом.

При разделении растительных пигментов была с успехом применена и обращенно-фазовая ВЭЖХ. Наиболее подходящим сорбентом для разделения этих липофильных соединений является, по-видимому, силикагель, обработанный октадецилсиланом (ODS), а элюентом — водный метанол [358, 359]. На колонке с 1%-ной ODS-пермафазой на зипаксе (Du Pont) в 95%-ном водном метаноле можно отделить фитоен от β -каротина и ретинола [360]. Описана также хроматография различных каротинов в ацетонитриле. Ликопин и α - и β -каротины были выделены из томатов при хроматографировании на колонке с партисилом 5 ODS (C_{18}) (Whatman), а в качестве элюента был использован 8%-ный раствор хлороформа в ацетонитриле [361]. Аналогичным образом на колонке со сферисорбом ODS было осуществлено разделение смеси, содержащей α -, β - и γ -каротины, ликопен и различные дитерпены [362]. В работе [363] суммированы данные об использовании ВЭЖХ для разделения каротиноидных пигментов и проведено сравнение характеристик методов ВЭЖХ, ТСХ и бумажной хроматографии (см. табл. 5.3).

Интересным вариантом метода ВЭЖХ является центрифужная хроматография, в которой движение элюента через сорбент обеспечивается высокой скоростью вращения колонок. Разделение смесей, содержащих вплоть до 0,5 мг каждого компонента, на мелкодисперсном силикагеле или оксиде магния в системе легкий петролейный эфир — метанол занимает 2—6 мин [364].

Гель-хроматография на сефадексе LH-20 в системе хлороформ — метанол — гексан оказалась особенно эффективным методом выделения каротиноидов из их смеси со стероидами [365, 366]. Для отделения каротинов от растительных белков и от других пигментов можно использовать ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе в 0,5 М растворе хлорида натрия [367]. В работе [368] описан модифицированный вариант обычного метода анализа каротинов и ксантофиллов, предусматривающий периодическое обновление смеси силикагеля 60 и хайфлосуперцела [368]. Время разделения на новой колонке составляет 30 мин, причем ее можно использовать четырежды.

Таблица 5.3. Разделение каротиноидов [363]

Соединение	ВЭЖХ ^а			ТСХ на силикагеле в системе ацетон — гексан		Круговая бумажная хроматография в системе ацетон — гексан	
	время удерживания, мин	содержание ацетона в элюенте, %	скорость формирования градиента, %/мин	[Me ₂ CO], %	R _f	[Me ₂ CO], %	R _f
β, ε-Каротин	4,2	0	0	2	0,71	0	0,70 ^б
β, β-Каротин	4,2	0	0	2	0,71	0	0,70 ^б
β, ψ-Каротин	4,6	0	0	2	0,64	0	0,55 ^б
Ликопен	5,0	0	0	2	0,57	0	0,35 ^б
2,2'-Диол	8,0	0→30	10	40	0,67	0	0,85 ^б
Лютеин	9,5	0→30	10	40	0,61	0	0,77 ^б
Зеаксантин	9,7	0→30	10	40	0,61	0	0,63 ^б
Неолютеин В	12,4	0→40	3				
Неолютеин А	13,1	0→40	3				
Полностью <i>транс</i> -лютеин	14,0	0→40	3	60	0,70	10	0,70 ^в
Неолютеин U	14,8	0→40	3	60	0,62	10	0,55 ^в
Неолютеин V	15,4	0→40	3	60	0,52	10	0,40 ^в
Необактериоруберин А	14,1	20→60	3	60	0,61	30	0,55 ^в
Полностью <i>транс</i> -бактериоруберин	14,6	20→60	3	60	0,41	30	0,50 ^в
Необактериоруберин U	15,1	20→60	3			30	0,40 ^в
Необактериоруберин V	16,0	20→60	3			30	0,40 ^в
Необактериоруберин W	16,3	20→60	3			30	0,40 ^в
3'-Эфир лютеина, эпимер 1	17,5	0→30	1	40	0,54	5	0,57 ^в
3'-Эфир лютеина, эпимер 2	17,9	0→30	1	40	0,54	5	0,57 ^в
Ауроксантин, эпимер 1	25,5	0→40	1	40	0,20	20	0,70 ^в
Ауроксантин, эпимер 2	25,9	0→40	1	40	0,20	20	0,70 ^в
Неохром, эпимер 1	17,5	0→40	3	60	0,63	20	0,80 ^в
Неохром, эпимер 2	17,8	0→40	3	60	0,63	20	0,80 ^в
Моно- <i>цис</i> -неохром	18,4	0→40	3	60	0,60	20	0,70 ^в

^а Колонка: 250×4,6 мм; сорбент: сферисорб; размер частиц 5 мкм; давление 2,069 МПа; элюент: 0,1% метанола в гексане; скорость потока: 1,4 мл/мин.

^б Бумага — шлейхер-шюльц № 288 (пропитанная оксидом алюминия).

^в Бумага — шлейхер-шюльц № 287 (пропитанная силикагелем).

5.8.2. Тонкослойная хроматография

Хайфлосуперцел нашел применение и в тонкослойной хроматографии. Смесь этого сорбента с оксидом магния и сульфатом кальция образует прочные слои, элюирование на которых можно проводить с высокой скоростью. Разделение неполярных каротинов на таких слоях протекает с хорошим разрешением [369]. На таких слоях можно, например, за один прием разделить все каротиноиды моркови. Хроматографический анализ пигментов хлоропластов перца *Capsicum* включает две стадии: сначала на пластинках с целлюлозой разделяют хлорофиллы и ксантофиллы, а затем смесь каротинов хроматографируют на тонком слое оксида магния и хайфлосуперцела [370]. На слоях из оксида магния элюирование можно вести легким петролевым эфиром. ТСХ на этом сорбенте в сочетании с УФ-детектированием составляет основу метода количественного определения α - и β -каротинов в биомассе [371]. Для обнаружения небольших количеств β -каротина предложен метод хроматографии в тонком слое, сформированном из смеси карбоната кальция, оксида магния и гидроксида кальция, в системе ацетон — легкий петролейный эфир — хлороформ (5:5:4) [372]. Проведен сравнительный анализ эффективности разделения главных пигментов на слоях из кукурузного крахмала, целлюлозы и микрокристаллической целлюлозы. В системе гептан — этилацетат — пропанол полное разделение было достигнуто на слоях из крахмала [373].

Растительные пигменты хроматографируют также в тонком слое силикагеля [374], однако этот сорбент, по-видимому, более подходит для выделения всей группы пигментов хлоропластов, чем для их разделения на индивидуальные компоненты. Так, например, на силикагеле, содержащем 10% сульфата аммония, можно лишь отделить каротины и феофитины от хлорофиллов, а разделить каротины практически не удастся. Используя высокоскоростной видеоденситометр, аналогичный применяемому в ТСХ аминокислот, можно оценивать количество вещества в каждом хроматографическом пятне, причем результаты такого анализа близки к полученным обычными спектрометрическими методами. Проводя элюирование смесями *трет*-бутанол — бензол (1:9) и *трет*-бутанол — пентан — ацетон (1:18:1), авторам работы [377] удалось быстро и достаточно легко отделить хлорофиллы и их производные от желтых каротиноидных пигментов. В системе дихлорметан — этилацетат — диэтиловый эфир (8:2:1) была полностью разделена смесь зеаксантина, лютеина и диэфира лютеина [377]. Индивидуальные компоненты элюировали с силикагеля этанолом и определяли их фотометрически. Хроматографическая подвижность астаксантина и кантак-

Таблица 5.4. Относительные времена удерживания
гидрированных каротиноидов и родственных соединений
в условиях ГЖХ [381]

Соединение	Относительное время удерживания ^a			
	изотермический режим		программированные температуры	
	SE-52	OV-17	SE-52	OV-17
Гераниллиналоол	—	—	0,15	0,13
Фитол	—	—	0,18	0,10
Геранилгераниол	—	—	0,21	0,15
Сквален	0,14	0,15	1,00	1,00
Холестан	0,16	0,18	1,00	1,00
Холестерин	0,28	0,49	1,69	1,67
Эргостерин	0,35	0,59	1,98	1,80
Стигмастерин	0,38	0,61	2,14	1,95
Ланостерин	0,44	0,72	2,31	2,11
Ликоперсен	1,03	1,38	3,95	2,76
Продукты гидрирования:				
ретинола	—	—	0,11	0,07
ретинала	—	—	0,10	0,06
кроцетина	—	0,02	0,13	0,13
диметилкроцетина	0,03	0,05	0,34	0,40
диэтилкроцетина	0,06	0,07	0,45	0,50
биксина	0,15	0,20	1,14	1,20
метилбиксина	0,14	0,19	1,08	1,18
β-апо-10'-каротиналя	0,06	0,05	0,42	0,41
азафрина	0,27	0,45	2,08	1,80
метилазафрина	0,21	0,37	1,70	1,73
скалена	0,09	0,07	0,66	0,54
4,4'-диапофитоена	0,09	0,07	0,67	0,53
4,4'-диапофитофлуена	0,09	0,06	0,67	0,54
4,4'-диапо-ζ-каротина	0,09	0,07	0,67	0,53
4,4'-диапонейроспорина	0,09	0,07	0,67	0,53
β-апо-8'-каротиналя	0,11	0,10	0,82	0,70
3,4-дегидро-β-апо-8'-каротиналя	0,11	0,10	0,82	0,69
β-апо-8'-каротиновой кислоты	0,23	0,24	1,57	1,40
метилового эфира β-апо-8'-каротиновой кислоты	0,24	0,26	1,61	1,46
этилового эфира β-апо-8'-каротиновой кислоты	0,26	0,28	1,77	1,50
β-апо-4'-каротиналя	0,30	0,26	2,10	1,44
ликоперсена	0,59	0,46	3,15	1,76
фитоена	0,60	0,45	3,14	1,77
фитофлуена	0,60	0,46	3,15	1,75
ζ-каротина	0,61	0,46	3,13	1,78
нейроспорина	0,60	0,46	3,14	1,77
ликопина	0,60	0,46	3,15	1,75
γ-каротина	0,78	0,67	3,66	2,24
β-зеакаротина	0,79	0,67	3,66	2,24
β-каротина	1,00	1,00	3,81	2,43
α-каротина	1,00	1,00	3,81	2,43
дегидро-β-каротина	1,00	1,00	3,81	2,43
каротинина	1,00	1,00	3,81	2,43
эсхининенона	1,71	2,25	4,65	3,19

Продолжение табл. 5.4

Соединение	Относительное время удерживания ^а			
	изотермический режим		программирование температуры	
	SE-52	OV-17	SE-52	OV-17
кантаксантина	2,85	3,01	5,90	3,66
β -каротинона	2,69	2,55	5,33	3,09
торулародина	1,07	1,26	4,23	2,58
капксантина	1,87	1,49	5,13	2,81
астацина	1,70	1,46	5,79	3,00
криптоксантина	1,27	1,43	4,14	2,55
ацетилкриптоксантина	1,23	1,76	4,10	2,53
триметилсилилкриптоксантина	1,47	1,82	4,12	2,54
изокриптоксантина	1,20	1,40	3,92	2,53
ацетилизокриптоксантина	1,21	1,74	3,78	2,44
триметилсилилизокриптоксантина	1,43	1,80	4,07	2,51
зеаксантина	1,68	2,21	4,68	3,30
диацетилзеаксантина	1,63	1,93	5,04	2,98
ди(триметилсилил)зеаксантина	1,66	1,91	5,07	3,05
изозеаксантина	1,48	1,90	4,16	2,59
диацетилизозеаксантина	1,54	1,64	4,31	2,47
ди(триметилсилил)изозеаксантина	1,58	1,58	4,35	2,53
диметоксизеаксантина	2,02	2,68	5,15	3,44
диметоксизизозеаксантина	1,23	1,46	4,02	2,37
фукоксантина	2,24	2,56	6,24	3,42
декапрено- β -каротина	6,35	6,87	7,54	5,32
Время удерживания, мин				
Сквален	0,70	2,48	5,50	11,50
Пергидро- β -каротин	5,13	16,65	20,95	27,09

^аВ изотермическом режиме (275 °C) стандартом служил пергидро- β -каротин, а в условиях программирования температуры (3 мин при 225 °C, затем увеличение температуры до 300 °C со скоростью 3 °C/мин) — сквален.

сантина из перьев фламинго на силуфоле UV-254 в системе дихлорметан — диэтиловый эфир (9:1) характеризуется значениями R_f соответственно 0,6 и 0,7 [378].

Интересной модификацией метода ТСХ является обращенно-фазовая ТСХ [379]. На химически связанной фазе C_{18} (ODS) в системе метанол — ацетон — вода (20:4:3) была разделена смесь пигментов хлоропластов шпината, содержащая неоксантин, хлорофиллы *a* и *b*, каротин, виолаксантин и лютеины. Этим же методом были разделены каротиноиды цитрусовых [380].

5.8.3. Газо-жидкостная хроматография

Ограниченное применение ГЖХ для анализа тетратерпенов обусловлено неустойчивостью этих высоконенасыщенных сое-

динений. Лишь тетратерпены с несопряженными двойными связями достаточно стабильны при температуре, необходимой для хроматографического разделения таких относительно больших молекул. Тетратерпены с сопряженными двойными связями перед вводом в хроматограф гидрируют, причем часто возникает необходимость защитить оксигруппы; для этой цели их ацетилируют или силилируют. Недостаток этой методики заключается в том, что при гидрировании исчезают различия между *цис*- и *транс*-изомерами. Хроматографические свойства продуктов гидрирования каротиноидов подробно изучены в работах [381, 382] (табл. 5.4.).

5.9. Полипrenoлы

Интерес к длинноцепочечным полипrenoлам, таким, как ундекапренол и долихолы (пrenoлы, содержащие от 16 до 22 изопреновых звеньев), обусловлен главным образом той ролью, которую играют соответствующие пренилфосфаты в биосинтезе сложных полисахаридов и гликопротеидов [383—385]. В некоторых растениях присутствует также относительно большое количество полипrenoлов с более короткой углеводородной цепью (например, бетулапrenoлы и фикапrenoлы, содержащие соответственно 6—8 и 10—13 изопреновых звеньев) [383, 386]. Соединения, принадлежащие к разным группам, различаются не только длиной цепи, но и относительным содержанием *цис*- и *транс*-двойных связей. Некоторые полипrenoлы (например, долихолы) построены из насыщенных α -изопреновых звеньев, а другие содержат аллильные звенья. Полипrenoлы, выделенные из одного источника, представляют собой, как правило, смесь аналогов, а не геометрических изомеров. Они встречаются как в свободной форме, так и в виде эфиров и более полярных производных — фосфатов и гликофосфатов (см. разд. 5.10 и 5.11).

5.9.1. Газо-жидкостная хроматография

Полипренилацетаты, пергидрополипренилацетаты и соответствующие углеводороды разделяли на колонках с целитом, содержащим 1% SE-30 [387, 388]. Для пренилацетатов из одного источника характерна линейная зависимость между числом изопреновых звеньев и логарифмом времени удерживания, что свидетельствует об идентичном расположении и одинаковой конфигурации двойных связей в молекулах этих соединений [388].

5.9.2. Тонкослойная хроматография

ТСХ наиболее часто применяется для разделения гомологичных полипrenoлов. Хотя в большинстве случаев силикагель не

отвечает требованиям, предъявляемым к сорбенту для анализа смесей полипренолов (исключение составляют очень простые смеси [389, 390]), тем не менее ТСХ на силикагеле является полезным вспомогательным методом, позволяющим отделить полипренолы от их низших аналогов (например, от геранилгераниола или прескваленола), а также от соответствующих альдегидов, кислот, фосфатов и ангидропроизводных, которые образуются как побочные продукты в ходе экспериментов при изучении биосинтеза соединений [391—393]. Гомологичные полипренолы можно эффективно разделить с помощью обращенно-фазовой ТСХ на кизельгуре, пропитанном парафином [394, 395], или на обработанной таким же образом целлюлозе [393] в системе ацетон—вода. Этот метод был с успехом использован для разделения разнообразных полипренолов [393, 396—401]. Установлено, что зависимость R_m полипренолов из одного источника от длины их цепи описывается прямой, наклон которой изменяется при переходе от одной серии гомологов к другой [394, 395]. С помощью обращенно-фазовой ТСХ удалось разделить некоторые геометрические изомеры полипренолов [397, 399]. Этот метод применим также для разделения изопреновых аналогов убихинона [402]. Для обнаружения полипренолов предложен ряд реагентов, из которых наиболее часто используют иод и смесь анисового альдегида с серной кислотой [393, 394].

5.9.3. Колоночная хроматография

Методики выделения полипренолов и их сложных эфиров включают стадию предварительной очистки этих соединений от липидов хроматографией на колонках с оксидом алюминия в системах алкан—диэтиловый эфир [394, 403, 404]. Для фракционирования таких смесей в качестве сорбента используют также кремниевую кислоту и сефадекс LH-20 [389].

Чистые полипренолы из их смесей были выделены с помощью колоночной хроматографии на носителе, пропитанном парафином [405]. Значительно более высокой разрешающей способностью обладает окси(C_{15})алкоксипропилсефадекс (липидекс-5000). На колонках с этим сорбентом в различных режимах элюирования системами ацетон—вода удалось с количественным выходом разделить смеси бетулапренолов, фикапренолов и долихолов на индивидуальные компоненты [406].

Недавно для разделения полипренолов была применена ВЭЖХ на колонках с пористым полимером [393] и с μ -бондапаком C_{18} [404, 407]. На обращенной фазе были полностью разделены долихолы [407] и смесь гомологичных полипренолов из можжевельника, содержащих от 14 до 21 изопренового звена

[404]. Геометрические изомеры полипренолов, вероятно, можно разделить в виде их ацетатов на сорбенте, содержащем соль серебра [229].

5.10. Фосфорилированные терпены

С введением остатков фосфорной или пирогосфорной кислоты в молекулы терпеноидов они превращаются в ионные соединения, обладающие совершенно другими хроматографическими свойствами. Степень влияния фосфатной группы на эти свойства зависит от молекулярной массы и полярности исходного терпена. Так, например, этот эффект нагляднее всего проявляется при фосфорилировании гемитерпенов и значительно слабее при фосфорилировании полипреноловых спиртов. Многие природные фосфорилированные терпены являются пирогосфатами аллиловых спиртов (например, гераниола, фарнезола) или циклопропилкарбинолов (пресквалеона и префитоенола). Эти эфиры чрезвычайно чувствительны к действию кислот и нагреванию, поэтому при работе с ними следует соблюдать определенные меры предосторожности. Однако некоторые фосфорилированные терпеноиды достаточно устойчивы к действию кислот. К их числу относятся насыщенные соединения, например фосфомевалонат или борнилпирогосфат, а также изопентенилпирогосфаты (гомоаллильные производные) и долихолфосфаты (соединения, молекулы которых построены из насыщенных α -изопреновых звеньев). В области исследования фосфорилированных терпеноидов к методу хроматографии прибегают главным образом в тех случаях, когда необходимо отделить терпенилпирогосфаты от соответствующих монофосфатов (с этой проблемой приходится сталкиваться при получении субстратов), или при проведении фракционирования терпенилпирогосфатов, различающихся длиной углеводородной цепи (такого рода задачи обычно возникают в ходе исследования биосинтеза соответствующих соединений, а также при выделении биосинтетических препаратов).

5.10.1. Бумажная хроматография

В силу своей полярности фосфорилированные терпены вполне пригодны для разделения при помощи бумажной хроматографии. Хорошее разделение фосфорилированных гемитерпенов (фосфатов и пирогосфатов мевалоновой кислоты, изопентенола и диметилаллилового спирта) и фосфатов терпеновых спиртов с более высокой молекулярной массой было достигнуто с помощью хроматографии на бумаге ватман № 1 или ЗММ в режиме восходящего или нисходящего элюирования

водно-спиртовыми смесями, содержащими кислоту или основание (в щелочной среде хроматографируют соединения, не стойкие в кислой среде) [408—413]. В работах [412—414] приведены величины R_f ряда фосфорилированных терпеноидов в различных системах растворителей. Главным недостатком бумажной хроматографии является низкая емкость сорбента, что ограничивает область применения этого метода — его используют по существу лишь в аналитических целях.

5.10.2. Тонкослойная хроматография

Сравнительно устойчивые фосфорилированные терпеноиды можно хроматографировать на силикагеле G в системах хлороформ — метанол — вода [409—411, 415—417]. Чтобы свести к минимуму возможность расщепления нестабильных аллиловых пирофосфатов, при приготовлении слоев сорбента вместо воды используют буферный раствор, например 0,1 М фосфат аммония с рН 6,5—7,0 [205, 418]. Подвижность терпенилпирофосфатов на таких «забуференных» слоях силикагеля Н в системе хлороформ — метанол — вода (6:4:1) характеризуется следующими значениями R_f : C_5 0,07, C_{10} 0,15, C_{15} 0,29, C_{20} 0,41, C_{25} 0,52, C_{30} 0,60, C_{40} 0,68. Аналогичная система растворителей была использована при разделении смеси ретиноил- и ретинилфосфатов [419]. Лабильные пирофосфаты хроматографируют также в системах пропанол-1 — гидроксид аммония — вода [393, 420] и хлороформ — метанол — гидроксид аммония — вода [421], состав которых зависит от относительной полярности разделяемых соединений. Например, для разделения смеси фосфатов C_{20} -пренола (геранилгераниола) была использована система пропанол-1 — гидроксид аммония — вода (6:3:1) [296]; найденные значения R_f три-, пиро- и монофосфатов равны соответственно 0,17, 0,35 и 0,52. Фосфорилированные терпеноиды можно разделять и на целлюлозе. Этот сорбент и силикагель Н обычно значительно более пригодны для разделения неустойчивых соединений, чем силикагель G [422—424]. Стабильные пирофосфаты были разделены на силикагеле в системе диизобутилкетон — уксусная кислота — вода (8:5:1) [425].

5.10.3. Колоночная хроматография

Предварительное фракционирование фосфорилированных пренолов было осуществлено на колонках с кремниевой кислотой [392, 415, 422, 423]. Фосфаты пренолов можно легко отделить от пирофосфатов с помощью хроматографии на силикаге-

ле в системе пропанол-1 — гидроксид аммония — вода [296, 426, 427].

Ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе [408, 410, 411, 417, 419, 427, 428] или на DEAE-сефадексе [30, 400] часто используют для отделения фосфатов от пирофосфатов, а в некоторых случаях и для разделения пирофосфатов [412, 514]. В зависимости от растворимости фосфорилированных пренолов хроматографию проводят в водных или метанольных системах в режиме градиентного элюирования растворами карбоната, бикарбоната, формиата или ацетата аммония. Изредка применяют также градиенты KCl [429] и K_2HPO_4 [412], хотя эти соли в отличие от перечисленных выше невозможно удалить лиофилизацией (это обстоятельство особенно важно учитывать при получении меченых фосфорилированных субстратов). С помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 в градиенте концентрации легколиофилизуемой соли — бикарбоната триэтиламмония — были очищены разнообразные фосфорилированные субстраты, используемые при изучении биосинтеза терпенов [430].

Разделение терпенилфосфатов и терпенилпирофосфатов проводят и на дауэксе-1. На этом ионите в градиенте из систем формиат аммония — муравьиная кислота были разделены фосфорилированные производные мевалоновой кислоты и изопентенола [431—433], однако в силу низкого значения рН элюента эта система непригодна для хроматографирования кислотолабильных аллильных производных [408, 434]. К числу подходящих для таких соединений элюентов относятся спиртовые растворы гидроксида аммония [433], растворы формиата аммония в метаноле [205, 435] и водные растворы хлорида лития при рН 8 [436]. На дауэксе удалось разделить позиционные изомеры — пирофосфаты фарнезола и неролидола [205]. Фосфорилированные пренолы с различной длиной цепи разделяют также с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-25 [425] и на сефадексе LH-20 [437]. В качестве альтернативного метода фракционирования терпенилфосфатов, по-видимому, найдет применение и хроматография на полистирольных смолах [438]. Обращенно-фазовая ВЭЖХ была использована для выделения ретинилфосфата [439]. При получении фосфорилированных субстратов следует принимать во внимание, что образующиеся в ходе ферментативных реакций неорганические фосфаты могут мешать последующей очистке целевого продукта [436, 440]. Предварительная обработка реакционной смеси неорганической пирофосфатазой позволяет избавиться от неорганического пирофосфата [441], а неорганические фосфаты можно удалить из неочищенных препаратов до стадии их колоночной хроматографии [427, 436].

5.11. Гликозилированные терпены

Необходимость хроматографирования самих терпенилгликозидов отпадает, если с помощью гидролиза этих соединений можно получить стабильные и легко разделяемые агликоны и при этом не теряется структурная информация (в частности, информация о положении функциональной группы, участвующей в образовании гликозидной связи с углеводным остатком). При исследовании иридоидов и секоиридоидов, составляющих одну из наиболее обширных групп терпенилгликозидов, гидролиз, как правило, не применяют, поскольку агликоны представляют собой лабильные диальдегиды [442, 443]. К числу нестабильных соединений относятся и некоторые агликоны тритерпеноидных сапонинов (например, сапогенин) [444]. В таких случаях приходится прибегать к хроматографированию либо самих гликозидов, либо их менее полярных производных, полученных, например, путем ацетилирования или силилирования. Последовательное хроматографирование незащищенных терпенилгликозидов, а затем их производных часто является наиболее эффективным методом выделения индивидуальных компонентов из сложных смесей [443—450]. Методики выделения и хроматографические свойства иридоидных гликозидов описаны соответственно в обзорах [443, 442]. Выделению тритерпеноидных сапонинов посвящена работа [444].

5.11.1. Газо-жидкостная хроматография

Метод ГЖХ нашел применение при анализе практически всех гликозидов, которые можно превратить в достаточно летучие производные [451]. Разделение триметилсилиловых эфиров иридоидных и секоиридоидных гликозидов с помощью ГЖХ и их масс-спектрометрический анализ описаны в работе [452]. Разделение таких соединений проводят, как правило, на колонках с низкой степенью покрытия носителя фазами типа силиконового масла (например, SE-30) [452—454]. Возможность применения ГЖХ для анализа других типов монотерпенилгликозидов продемонстрирована в работе [105] на примере разделения сполна ацетилированных производных (\pm)-ментил- и (\pm)-борнил- β -D-гликозидов на фазах, содержащих силиконовое масло. С помощью ГЖХ были разделены также гиббереллин-О-гликозиды в виде сполна триметилсилилированных производных или в виде производных, в которых гидроксильные группы защищены триметилсилильными остатками, а карбоксильные — метильными [264, 455]. Последний пример свидетельствует о том, что метод ГЖХ пригоден и для разделения терпенилгликозидов, обладающих сравнительно высокой молекулярной массой.

5.11.2. Тонкослойная хроматография

Аналитическая и препаративная ТСХ (в большинстве случаев на силикагеле) широко используется в качестве метода разделения как незащищенных иридоидных и секоиридоидных глюкозидов, так и их производных [442, 443, 447, 448]. Разделение смеси тетраацетатов иридоидных глюкозидов, молекулы которых различаются лишь числом двойных связей, было осуществлено на силикагеле, содержащем 17% нитрата серебра [456]. Этим методом были разделены также другие типы монотерпенилглюкозидов [457], кроме того, он пригоден и для разделения диастереомеров, например β -D-глюкозидов ментола и неоментола [458]. С помощью ТСХ на силикагеле можно разделить смеси незащищенных и ацетилированных гиббереллингликозидов [254, 459], а также тритерпенилглюкозиды и их сложные эфиры [327, 460]. Гликозилированные тетратерпены (каротиноиды) и ацетаты этих гликозидов были разделены на кизельгуре [461]. ТСХ на силикагеле и на кизельгуре обычно используют при выделении полипренилфосфатов, содержащих углеводные остатки [399, 416, 462—464].

5.11.3. Колоночная хроматография

Колоночная хроматография является хорошо отработанным методом препаративного выделения иридоидных и секоиридоидных глюкозидов [443] и других монотерпенилглюкозидов [446, 465]. Иридоидные и секоиридоидные глюкозиды хроматографируют на кизельгуре, полиамиде, целлюлозе, силикате магния, сефадексе LH-20, на разнообразных анионитах (при выделении соединений кислотной природы) и на силикагеле [443]. Последний сорбент нашел также применение при фракционировании производных монотерпенилглюкозидов [443, 448, 449]. Иридоидные и секоиридоидные глюкозиды были разделены также с помощью ВЭЖХ на μ -бондапаке C_{18} [466].

Различные методики колоночной хроматографии используются для предварительного фракционирования дитерпеновых гликозидов [467, 468] и гиббереллингликозидов [264, 469], причем в последнем случае особенно эффективной является ионообменная хроматография [304]. Хорошее разделение гликозилированных гиббереллинов можно достичь и с помощью ВЭЖХ [469]. Этим методом все чаще пользуются при фракционировании тритерпеноидных гликозидов [470] и родственных сапонинов [471, 472]. Для очистки сапонинов применяют также обычную колоночную хроматографию на силикагеле [473, 474], оксиде алюминия [475], смеси древесного угля с целитом [476], полиамиде [477] и DEAE-сефадексе [478]. Каротиноидные глико-

зиды были разделены на колонках с целлюлозой, а соответствующие ацетаты — на колонках с оксидом алюминия [461]. Производные полипренилфосфатов, содержащих углеводные остатки, обычно хроматографируют на DEAE-целлюлозе [392, 399, 479—482] или на сефадексе LH-20 [415, 479, 482, 483]. Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ был выделен маннозилретинилфосфат [439].

5.11.4. Бумажная хроматография и другие методы

Несмотря на то что в связи с расширением области применения ТСХ бумажная хроматография как метод анализа терпенилгликозидов в значительной мере утратила свои позиции, ее до сих пор используют для разделения и характеристики иридоидных глюкозидов [442, 484] и полипренилфосфатов сахаров [485—487]. Иридоидные глюкозиды обычно идентифицируют с помощью двумерной бумажной хроматографии [488].

Эффективным способом разделения смесей иридоидных и секоиридоидных глюкозидов является противоточное распределение [489—491]. Усовершенствованный вариант этого классического метода — капельная противоточная хроматография — широко применяется при разделении гликозидов [492, 493], особенно иридоидов [494] и сапонинов [495—499].

5.12. Терпеноидные витамины

5.12.1. Витамин А

Огромный интерес к витамину А и его производным обусловлен не только его функциональной ролью в зрительном процессе, но также и тем, что на основе его аналогов могут быть созданы эффективные лекарственные препараты, позволяющие проводить профилактику и лечение рака и кожных заболеваний. Поскольку исследования системы фоторецепции сопряжены с использованием различных *цис*-ретиноидов, значительные усилия были направлены на разработку методов разделения и очистки этих изомеров [500—503]. Характерной особенностью всех производных витамина А является их чрезвычайная лабильность: они очень чувствительны к воздействию воздуха, тепла и света, поэтому в данном случае традиционные методы хроматографии пригодны лишь для рутинных анализов. С соблюдением особых мер предосторожности эти соединения можно хроматографировать на пластинках с силикагелем в системах диэтиловый эфир — углеводород [504, 505]. Обычно пластинки необходимо активировать, выдерживая их 30—60 мин при 110—120 °С, и проводить разделение в темноте [506] при

температуре ниже комнатной. Введение антиоксидантов позволяет в значительной степени предотвратить окисление анализируемых соединений. В частности, перед элюированием пластинки можно опрыскивать раствором 2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезола [507]. Этот антиоксидант не мешает обнаружению ретиноидов по их поглощению при 366 нм, поскольку его полоса поглощения расположена в более коротковолновой области (ниже 300 нм). В работе [507] описано разделение производных витамина А с помощью ТСХ на силикагеле в системе ацетон — легкий петролейный эфир (9:41) при 8°C. Найдены следующие значения R_f : ретинилпальмитат 0,71, ретинилацетат 0,54, ретиналь 0,40, ретинол 0,26, ретиновая кислота 0,21. Выход указанных соединений составил 75—94%.

Термическая нестойкость и низкая летучесть ретиноидов осложняют их разделение с помощью газовой хроматографии [508]. Очевидно, что в данном случае все контактирующие с анализируемыми веществами детали хроматографа должны быть выполнены из стекла. Наилучшее разделение эфиров ретиновой кислоты было достигнуто на колонках с низкой степенью покрытия носителя фазой SE-30, которая обладает некоторыми преимуществами перед жидкими фазами XE-52 и QF-1. На колонке, содержащей 3% SE-30 на хромосорбе WHP (Supelco, 80—100 меш), в изотермическом режиме (230°C) удалось разделить полностью *транс*- и 13-*цис*-изомеры метилретината. ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией позволяет обнаружить указанные вещества при их концентрации в крови человека до 1 нг/мл [509].

Колоночная хроматография, являющаяся, несомненно, наиболее распространенным методом разделения соединений группы витамина А, обеспечивает высокое разрешение при минимальной вероятности расщепления анализируемых веществ. Среди многих использованных в этих целях типов сорбентов первое место принадлежит силикагелю. Иногда применяют также щелочной оксид алюминия [504]; в частности, на этом сорбенте проводят анализ смесей, содержащих помимо ретиноидов каротины и ксантины [510]. С помощью хроматографии на целите 345 в гексане, насыщенном полиэтилснгликолем 400 и содержащем антиоксиданты, удается отделить полностью *транс*-ретинол от его 9,13-ди-*цис*-изомера, однако 9-*цис*- и 13-*цис*-изомеры в этой системе не разделяются [511].

В связи со стремительным развитием ВЭЖХ коренным образом изменился характер методики анализа соединений группы витамина А. Благодаря своим неоспоримым преимуществам — высокой скорости, высокой чувствительности и высокой разрешающей способности — ВЭЖХ к настоящему времени практически вытеснила все остальные методы разделения ретиноидов.

Адсорбционная ВЭЖХ позволяет освободиться от примеси каротиноидов [512], выделить все геометрические изомеры витамина А и его эфиров [513—516] из биологических жидкостей [515] и пищевых продуктов [517] или осуществить препаративное разделение этих соединений [513, 516]. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в равной степени пригодна как для анализа биологических жидкостей [518—520] и пищевых продуктов [521—525], так и для разделения производных витамина А [526, 527]. Эфиры ретинола и ненасыщенных жирных кислот легко разделить на обращенной фазе в системе, содержащей метанольный раствор нитрата серебра [527].

На колонках с микро-пак- СН-10 витамин А легко отделяется от витаминов D₂ и Е [528]. Адсорбционная хроматография на сорбенте микро-пак (5 мкм) в системе гексан — диоксан позволяет разделить все *цис/транс*- и *син/анти*-изомеры оксима ретиналя, образующиеся при обработке зрительных пигментов гидроксиламином [505, 529]. Партисил оказался особенно подходящим сорбентом для разделения ретиновых кислот и эфиров. Изомерные ретинаты можно разделить на колонках с партисилом 10 ODS-2 в системе ацетонитрил — 1%-ный водный раствор ацетата аммония (3:2) [530, 531] или дихлорметан — уксусная кислота (199:1) [532]. Для колонок с обращенной фазой партисил ODS характерна меньшая скорость потока элюента, чем для колонок с партисилом (10 мкм) или сферисорбом ODS (5 мкм) [532]. Все *цис/транс*-изомеры метилретиноата можно разделить на партисиле ODS-2 в системе гептан — ацетонитрил — диметилсульфоксид [533].

Для определения соединений группы витамина А в различных сортах маргарина используют хроматографию на лихросорбе Si 60 в системе гептан — диизопропиловый эфир (19:1). Поскольку глиcerиды, токоферолы, лецитины и другие полярные соединения сорбируются на колонке, в нее можно вводить неочищенные препараты, причем регенерировать колонку необходимо лишь после 20—50 анализов [534]. На этом же сорбенте проведено определение ретинола в сыворотке крови [535], а также разделение аналогов ретиновой кислоты и их метаболитов в системах гексан — тетрагидрофуран — уксусная кислота (980:15:6) или гексан — метилбензоат — пропионовая кислота (1750:250:7) [536]. С помощью обращенно-фазовой хроматографии на лихросорбе (10 мкм) в 90%-ном водном метаноле проводят анализ молока и детских питательных смесей [537], а в системе метанол — вода (99:1) разделяют каротины.

цис/транс-Изомеры ретиналя и ретинола можно легко разделить на колонке с зорбакс-силом в системах диэтиловый эфир — гексан, этилацетат — гексан или этилацетат — дихлорметан — гексан. По данным работ [538, 539], эта колонка осо-

бенно удобна для разделения продуктов фотизомеризации ретиналя (элюент — 12%-ный раствор диэтилового эфира в гексане), и на ней можно разделить четыре изомера ретинола в присутствии соответствующих изомеров ретиналя. Изомеры ретиналя и 3-дегидроретиналя хроматографировали на μ -порасиле. В режиме изократического элюирования 2%-ным раствором диэтилового эфира в легком петролейном эфире разделяют 9-*цис*-, 11-*цис*-, 13-*цис*- и полностью *транс*-изомеры [540], а при концентрации диэтилового эфира 6—8% отделяют 11-*цис*-ретинол от 11-*цис*-3-дегидроретиналя [541].

Систему из двух колонок с обращенной фазой использовали для одновременного определения ацетата витамина А (или других соединений группы витамина А), витамина D₂ и ацетата витамина Е. Превосходные результаты были получены при разделении указанных соединений на последовательно соединенных колонках с фенил- μ -бондапаком и μ -бондапаком C₁₈ в режиме градиентного элюирования смесью метанола и воды, причем длительность анализа составила 50 мин [542]. Этот метод пригоден и для анализа *цис/транс*-изомеров ретиновой кислоты (предел обнаружения около 1 нг) [543].

Изучена также возможность применения гель-хроматографии для разделения соединений группы витамина А. Этот метод оказался особенно полезен в тех случаях, когда необходимо отделить ретиноиды от больших количеств других липофильных веществ, присутствующих, например, в маргаринах и других пищевых продуктах [544—546]. С помощью хроматографии низкого давления на сефадексе LH-20 в системах хлороформ — легкий петролейный эфир можно достичь хорошего разделения смеси, содержащей ретинол, его сложные эфиры, ретинол, ретиновые кислоты и эфиры этих кислот, однако данный гель, по-видимому, непригоден для разделения *цис/транс*-изомеров [546, 547]. В этой области исследований нашла применение и высокоэффективная гель-хроматография. Хитаки гель 3010 был использован для определения витамина А и β -каротина в жирах и масле [548], а последовательно соединенные колонки с μ -стирагелем (100 Å) и μ -бондапаком C₁₈ — для отделения ретинола от β -каротина [544].

5.12.2. Витамин Е

Термин «витамин Е» в действительности относится к группе из восьми природных фенолов, известных под названиями токоферолы и токотриенолы. Четыре токоферола, в состав молекул которых входит насыщенная изопреноидная цепь, отличаются друг от друга числом и положением метильных групп в ароматическом кольце. Поскольку биологическая активность

этих соединений неодинакова, важно провести между ними различие. Прежние методики колориметрического анализа витамина Е были неспецифичны, причем надежность результатов определялась тщательностью очистки препарата от примеси восстановителей [549—551]. Определению витамина Е посвящен ряд обзоров [551—559].

Соединения группы витамина Е сравнительно стабильны, поэтому их хроматографическое разделение представляет собой довольно простую процедуру и требует соблюдения минимально-необходимых мер предосторожности. Эти вещества экстрагируют обычными органическими растворителями (гексаном, диэтиловым эфиром, дихлорметаном), а затем путем гидролитической обработки сырого экстракта получают содержащую витамин Е фракцию неомыляемых липидов, которые можно легко разделить с помощью различных хроматографических методов. Единственное серьезное осложнение возникает при анализе пищевых продуктов, содержащих сложные эфиры витамина А. В этом случае явно необходимо исчерпывающее омыление образца, поскольку примесь указанных эфиров мешает хроматографии, а сам ретинол легко отделяется от токоферолов.

ТСХ нашла широкое применение в качестве метода определения витамина Е во многих различных веществах: продуктах питания, тканях животных и фармацевтических препаратах [551, 560—562]. Большинство токоферолов можно легко разделить на пластинках с силикагелем в системах гексан—этилацетат (37:3) [563], циклогексан—диэтиловый эфир (4:1) [564] или в дихлорметане [565]. С помощью этого метода нельзя, однако, разделить позиционные изомеры— β - и γ -токоферол [563].

Токоферолы обнаруживают в виде соответствующих хинонов [565]. Реакция окисления протекает легко, причем образующиеся окрашенные зоны пригодны для количественного определения веществ с помощью методов денситометрии [562]. Эту реакцию проводят путем опрыскивания пластинок раствором трихлоруксусной кислоты, содержащей ионы Ce^{4+} , с последующей нейтрализацией кислоты парами аммиака [562] или 2,6-дихлор-*п*-бензохинон-4-хлорамином (реагентом Гиббса) [566] либо просто путем нагревания пластинок на воздухе при 110 °С в течение 18 ч [567]. Сами по себе продукты окисления можно хроматографировать на силикагеле в бензоле или в системе: легкий петролейный эфир—диэтиловый эфир—ацетон (94:5:1) [568].

Обращенно-фазовая хроматография в тонком слое крахмала, целлюлозы или талька, пропитанных минеральным маслом, в системе ацетон—уксусная кислота (3:2) позволяет отделить α -токоферол от его ацетата [569]. Колоночный вариант этого

метода был использован для отделения витаминов А и D от витамина Е [570]. В этих же целях пригодна гель-хроматография на сефадексах G-50 и LH-20 в хлороформе [571].

Методы ТСХ часто объединяют с ГЖХ, поскольку последняя отличается большей чувствительностью и более пригодна для количественных определений [572]. В этом случае пластинки опрыскивают раствором родамина G или 2,7-дихлорфлуоресцеина (либо хроматографию проводят на пластинках, содержащих указанные флуоресцентные индикаторы), соединения группы витамина Е обнаруживают по тушению индуцированной УФ-облучением флуоресценции, соответствующие зоны сорбента соскабливают, вещества экстрагируют и анализируют с помощью ГЖХ [573, 574]. Газо-жидкостная хроматография является, по-видимому, основным методом определения токоферолов и их сложных эфиров в различных объектах [575—578]. Большинство исследователей используют колонки с низкой степенью покрытия носителя неподвижной фазой, например 0,3% апиезона L [578, 579] или 2—5% SE-30 на газохроме Q или хромосорбе HP [572, 574, 576] либо OV-1 на газохроме Q [580]. Для хроматомасс-спектрометрического анализа была применена колонка, содержащая 1% OV-1 (разделение проводили при 240 °C) [580]. Согласно данным работ [572, 573], фаза SE-30 предпочтительнее OV-17, поскольку время удерживания анализируемых соединений на ней меньше. Недостаток насадочных колонок заключается в том, что на них трудно отделить β-токоферол от γ-токоферола. Высокой разрешающей способностью обладают открытые капиллярные колонки с непористым слоем, внутренняя поверхность которых дезактивирована силаноксом и покрыта полярной фазой — сульфеном полифенилового эфира [581]. На таких колонках разделяют токоферолы в виде их триметилсилильных производных.

Наиболее значительные достижения в области анализа соединений группы витамина Е, несомненно, связаны с применением ВЭЖХ. Хотя в некоторых методиках хроматографии и предусмотрена некая предварительная обработка образцов, в частности омыление или осаждение определенных компонентов [582—585], чаще всего необходимость в такой обработке отсутствует, т. е. непосредственно на колонку можно наносить неочищенные экстракты. Например, неочищенные экстракты липидов из крупных изделий можно хроматографировать на μ-порасиле в системе гексан — хлороформ (17:3) [586]. В этих условиях ретинилпальмитат полностью отделяется от ацетата α-токоферола. Обычно присутствие других липидов не препятствует анализу соединений группы витамина Е, однако в одном из сообщений отмечается, что β-каротин мешает количественному определению убихинона [587]. Обнаружение по флуорес-

ценции позволяет исключить влияние примесей на результаты анализа. Если для возбуждения использовать свет с длиной волны 298 нм, а интенсивность флуоресценции определять при 325—335 нм, то предел обнаружения токоферола составляет 30 нг [588—594]. Уменьшение длины волны возбуждающего света до 205 нм приводит к 20-кратному увеличению чувствительности определения [595].

Рутинные анализы соединений группы витамина Е, по-видимому, целесообразно проводить на колонках с обращенной фазой, а для разделения смесей токоферолов и их ацетатов необходимы колонки с адсорбентами [596]. Наиболее трудной задачей является отделение β -токоферола от γ -токоферола [580, 597]. В общем случае хроматография на колонках с μ -бондапаком C_{18} в системе метанол — вода (19:1) позволяет получить вполне удовлетворительные результаты [598—600], однако разделения смеси всех восьми соединений группы витамина Е можно достичь лишь с помощью адсорбционной хроматографии. Подвижной фазой обычно служат углеводороды, содержащие незначительное количество какого-либо простого эфира. С большинства адсорбентов токоферолы элюируются в следующей последовательности: α , β , γ , δ . Для аналитической хроматографии на адсорбентах лихросорб Si-60 (размер частиц 50 мкм) [592], джаско-пак WC-03-500 [593] и корасил I [601] в качестве элюентов были использованы 0,2—4%-ные растворы диизопропилового эфира в гексане, а эффективное препаративное выделение вышеуказанных соединений было осуществлено на корасиле II элюированием 0,5%-ным раствором тетрагидрофурана в гексане [602]. На колонках со сферисорбом (размер частиц 5 мкм) в системе гексан — изопропанол (399:1) при скорости потока 0,8 мл/мин были разделены все четыре токоферола. Относительные индексы удерживания α -, β -, γ - и δ -токоферолов в этих условиях равны соответственно 1,00, 1,44, 1,59 и 2,46 (время удерживания α -токоферола составляет 4,5 мин).

5.12.3. Витамин К

Витамин К существует в двух формах, различающихся степенью ненасыщенности изопреноидной боковой цепи, связанной с нафтохиноновым ядром. В углеводородной цепи молекулы филохинона присутствует лишь одна двойная связь, в молекуле же менахинона ненасыщенным является каждое изопреноидное звено, причем в состав молекулы может входить разное число таких звеньев. Последнее обстоятельство затрудняет разделение гомологичных менахинонов с помощью адсорбционной хроматографии, поскольку такие соединения лишь незначительно различаются по силе взаимодействия с сорбентом [603].

Витамины К очень легко подвергаются фотоокислению с образованием целого набора разнообразных соединений, которые являются, по-видимому, продуктами взаимодействия этих витаминов с молекулами кислорода в синглетном состоянии [604]. Эти продукты фотоокисления анализировали с помощью ГЖХ на колонке, содержащей 3% OV-1 на хромосорбе W, при температуре 260°C [605], а также с помощью метода ГЖХ в сочетании с масс-спектрометрией [604].

В области исследования витаминов К нашли применение методы тонкослойной хроматографии [606—609], однако ни одна из хроматографических систем не позволяет разделить все соединения, относящиеся к этой группе витаминов. Разделение витаминов К проводилось на слоях оксида алюминия, пропитанного раствором β,β' -оксидипропионитрила, силикагеля и силикагеля, пропитанного полиэтиленгликолем 200 [607], кизельгура, пропитанного парафином [608], сорбентов, содержащих нитрат серебра [608, 610], и сорбентов с привитыми октадециальными остатками [609]. Наиболее селективным является, по-видимому, обращенно-фазовая распределительная ТСХ (см. табл. 5.5).

Таблица 5.5. ТСХ витаминов К и некоторых их производных на силикагеле G (А), кизельгуре, пропитанном парафином (Б), и силикагеле G, содержащем 10% (по массе) нитрата серебра (В) [608]^а

Соединение	Значения R_f		
	колонка А	колонка Б	колонка В
Менахинон-4	0,29	0,66	0,48
2,3-Эпоксименахинон-4	0,27	0,81	0,46
Диметилменахинон-4	0,27	0,72	0,45
Менахинон-3	0,28	0,79	0,67
2,3-Эпоксименахинон-3	0,27	0,89	0,59
Филлохинон	0,35	0,38	0,97
2,3-Эпоксифиллохинон	0,33	0,59	0,91
Менадион	0,12	0,96	0,62

^а Системы растворителей: колонка А — 6% диэтилового эфира в легком петролейном эфире; колонка Б — 90%-ный водный ацетон; колонка В — 60% диизопропилового эфира в легком петролейном эфире.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ также оказалась предпочтительнее адсорбционной хроматографии, хотя в некоторых случаях вполне удовлетворительного разделения можно достичь и на колонках с лихросорбом (размер частиц 5 мкм) при элюировании 0,03%-ным раствором изопропанола в гексане [611], а также на колонках с силикагелем в системах ацетонитрил — гек-

Таблица 5.6. Времена удерживания витаминов К и их производных на колонках с μ -бондапаком C_{18} [608]^a

Соединение	Время удерживания, мин		Соединение	Время удерживания, мин	
	колонка А	колонка Б		колонка А	колонка Б
Менахинон-4	27,5	—	Филлохинон	—	9,6
2,3-Эпоксименахинон-4	20,0	—	2,3-Эпоксифиллохинон	—	7,2
Менахинон-3	17,0	—	Менадион	5,0	—
2,3-Эпоксименахинон-3	12,0	—			

^a Колонка А: 300×3 мм (внутр. диаметр), элюент — 85%-ный водный ацетонитрил; колонка Б: 200×2 мм (внутр. диаметр), элюент — метанол.

сан или дихлорметан — гексан [612, 613]. Большинство анализов соединений группы витамина К выполнено с помощью метода обращенно-фазовой хроматографии на μ -бондапаке в водном ацетонитриле [608], на пермафазе ODS в 63%-ном водном диоксане или 89%-ном водном метаноле [613, 614], на нуклеосиле C_{18} в системе метанол — этанол (7:3) [615], на зорбаксе ODS в системах метанол — этилацетат (43:7) [616], метанол — дихлорметан (4:1) или ацетонитрил — дихлорметан

Таблица 5.7. Коэффициенты емкости соединений группы витамина К в условиях ВЭЖХ [612]

Соединение	Коэффициент емкости						
	силикагель		C ₁₈ HL			C ₈	—CN
	0,2% MeCN в гексане	10% CH ₂ Cl ₂ в гексане	MeOH	MeOH — MeCN (1 : 1)	MeCN	MeCN	0,05% MeCN в гексане
<i>цис</i> -Витамин K ₁	4,4	5,8	7,6	8,7	13,0	5,6	4,2
<i>транс</i> -Витамин K ₁	5,2	6,9	7,6	8,7	13,0	5,6	4,6
Эпоксивитамин K ₁	6,1	6,5	4,7	5,2	7,3	4,2	5,5
Менахинон-2	8,7	—	1,8	1,7	1,9	1,7	—
Менахинон-4	8,8	8,8	4,3	4,2	5,1	3,0	7,5
Менахинон-9	9,5	10,3	—	—	—	27,7	9,0

(7:3) [617]. В табл. 5.6 приведено время удерживания витаминов К и некоторых их производных на колонках с μ -бондапаком C_{18} . Чтобы облегчить анализ биологических жидкостей, можно сначала выделить фракцию витаминов К с помощью хроматографии на партисиле 5 в системе гексан — диэтиловый эфир (97:3), а затем разделить эту смесь на обращенной фазе [617]. Если же анализируется молоко, для предварительного фракционирования лучше всего подходит колонка с партисилом 10 PAC [617]. Приведенные в табл. 5.7 данные позволяют сравнить различные системы ВЭЖХ.

Литература

1. Baas W. J., Niemann G. J. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **1**, 18 (1978).
2. Adams M. A., Nakanishi K. J. Lipid Chromatogr., **2**, 1097 (1979).
3. Pryde A., Dielsdorf M. A. G., Gilbert M. T. Applications of High Performance Liquid Chromatography, New York: Wiley, 1979.
4. Kingston D. G. I. J. Nat. Prod., **42**, 237 (1979).
5. Zweig G., Sherma J. (Editors). CRC Handbook Series in Chromatography, Terpenoids. FL. Boca Raton: CRC Press, 1982.
6. Bardenheier J. W., Popják G. Biochem. Biophys. Res. Commun., **74**, 1023 (1977).
7. Goodwin C. D., Margolis S. J. Lipid Res., **17**, 297 (1976).
8. Shapiro D. J., Imblum R. L., Rodwell V. W. Anal. Biochem., **31**, 383 (1969).
9. Shapiro D. J., Nordstrom J. L., Mitschelin J. J., Rodwell V. W., Schimke R. T. Biochim. Biophys. Acta, **370**, 369 (1974).
10. Shefer S., Hauser S., Lapar V., Mosbach E. H. J. Lipid Res., **13**, 402 (1972).
11. Murthy H. R., Moorjani S., Lupein P.-J. Anal. Biochem., **81**, 65 (1977).
12. Linn T. C. J. Biol. Chem., **242**, 984 (1967).
13. Fogelman A. M., Edmond J., Seager J., Popják G. J. Biol. Chem., **250**, 2045 (1975).
14. Goldfarb S., Pitot H. C. J. Lipid Res., **12**, 512 (1971).
15. Brown M. S., Dana S. E., Dietschy J. M., Siperstein M. D. J. Biol. Chem., **248**, 4731 (1973).
16. Brooker J. D., Russell D. W. Arch. Biochem. Biophys., **167**, 723 (1975).
17. Murthy H. R., Lupien P.-J., Moorjani S. Anal. Biochem., **89**, 14 (1978).
18. Green T. R., Baisted D. J. Anal. Biochem., **38**, 130 (1970).
19. Guchait R. G., Porter J. W. Anal. Biochem., **15**, 509 (1966).
20. Siperstein M. D., Fagan V. M., Dietschy J. M. J. Biol. Chem., **241**, 597 (1966).
21. Hamprecht B., Lynen F. Eur. J. Biochem., **14**, 323 (1970).
22. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Popják G., Yengoyan L. J. Biol. Chem., **241**, 3970 (1965).
23. White L. W., Rudney H. Biochemistry, **9**, 2713 (1970).
24. Huber J., Latzin S., Hamprecht B. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1645 (1973).
25. Avigan J., Balthena S. J., Schreiner M. E. J. Lipid Res., **16**, 151 (1975).
26. Edwards P. A., Popják G., Fogelman A. M., Edmond J. J. Biol. Chem., **252**, 1057 (1977).
27. Sanghvi A., Parikh B. Biochim. Biophys. Acta, **444**, 727 (1976).

28. Cardemil E., Vicuña J. R., Jabalquinto A. M., Cori O. *Anal. Biochem.*, **59**, 636 (1974).
29. Jedlicki E., Jacob G., Faini F., Cori O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 590 (1972).
30. Cardemil E., Cori O. *J. Labelled Compd.*, **9**, 15 (1973).
31. McCloud T. G., Heinsteins P. J. *Chromatogr.*, **174**, 461 (1979).
32. McSweeney G. P. *J. Chromatogr.*, **17**, 183 (1965).
33. Oster M. O., West C. A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 112 (1968).
34. Sanadze G. A. *Fiziol. Rast.*, **8**, 555 (1971).
35. Rasmussen R. A. *J. Air Pollut. Control. Assoc.*, **22**, 537 (1972).
36. Naveau J. J. *Chromatogr.*, **174**, 109 (1979).
37. DeMaster E. G., Hagasawa H. T. *Life Sci.*, **22**, 91 (1978).
38. Von Rudloff E. *Recent Advan. Phytochem.*, **2**, 127 (1969).
39. Von Rudloff E. *Advan. Chromatogr.*, **10**, 173 (1974).
40. Hayashi S. *Method. Chim.*, **11**, 44 (1978).
41. Rogers J. A. *Perfum. Flavor.*, **3**, 41 (1979).
42. *Anal. Meth. Comm. Analyst (London)*, **96**, 887 (1971); **105**, 262 (1980).
43. Ziegler E. — In: *Vorkommen und Analytik ätherscher Öle*./Ed. Kubeczka K.-H. Stuttgart: Thieme, 1979, p. 124.
44. Prihl J. S. — In: *Spices and Condiments: Chemistry, Microbiology, Technology*./Eds. Chichester C. O., Mrak E. M., Stewart G. F. New York: Academic Press, 1980, p. 69.
45. Bonmati R., Guiochon G. *Perfum. Flavor.*, **3**, 17 (1978).
46. Masada Y. *Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. New York: Wiley, 1976.
47. von Schantz M. — In: *Vorkommen und Analytik ätherischer Öle*./Ed. Kubeczka K.-H. Stuttgart: Thieme, 1979, p. 88.
48. Hendriks H., Bruins A. P. *J. Chromatogr.*, **190**, 321 (1980).
49. Srinivas S. R., Borecki D. C. *Proc. 6th Int. Congr. Essent. Oils*, San Francisco. Oak Park: Allured Publ., 1974, p. 34.
50. Adams R. P., Granat M., Hogge L. R., von Rudloff E. *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 75 (1979).
51. Gilbertson G., Koenig R. T. *Anal. Chem.*, **51**, 183R (1979).
52. Lawrence B. M. *Perfum. Flavor.*, **5**, 27 (1980).
53. Cermak J., Penka M., Tesarik K. *Acta Univ. Agric. Ser. C. (Brno)*, **47**, 3 (1978).
54. Koedam A., Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **6**, 1 (1979).
55. Maarse H., Kepner R. E. *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 1095 (1970).
56. Baerheim Svendsen A., Karlson J. *Planta Med.*, **14**, 376 (1966).
57. Henderson W., Hart J. W., How P., Judge J. *Phytochemistry*, **9**, 1219 (1970).
58. Senanayake U. M., Edwards R. A., Lee T. H. *J. Chromatogr.*, **116**, 468 (1976).
59. Minyard J. P., Tumlinson J. H., Hedin P. A., Thompson A. C. *J. Agr. Food Chem.*, **13**, 599 (1965).
60. Klouwen M. H., ter Heide R. *J. Chromatogr.*, **7**, 297 (1962).
61. Gillen D. G., Scanlon J. T. *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 729 (1972).
62. von Rudloff E. *Can. J. Chem.*, **38**, 631 (1960).
63. Geyer S., Mayer R. *Z. Chem.*, **5**, 308 (1965).
64. ter Heide R. *Z. Anal. Chem.*, **236**, 215 (1968).
65. ter Heide R. *J. Chromatogr.*, **129**, 143 (1976).
66. Saeed T., Redant G., Sandra P. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 75 (1979).
67. Jennings W., Shibamoto T. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. New York: Academic Press, 1980.

68. Swigar A. A., Silverstein R. M. Monoterpenes, WI, Milwaukee: Aldrich Chemical Co., 1981.
69. Morishita F., Okano T., Kojima T. Bunseki Kagaku, **29**, 48 (1980).
70. Watts R. B., Kekwick R. G. O. J. Chromatogr., **88**, 15 (1974).
71. Tyson B. J. J. Chromatogr., **111**, 419 (1975).
72. Vinutha A. R., von Rudloff E. Can. J. Chem., **46**, 3743 (1968).
73. Bapat B. V., Ghatge B. B., Bhattacharyya S. C. J. Chromatogr., **18**, 308 (1965).
74. Bapat B. V., Ghatge B. B., Bhattacharyya S. C. J. Chromatogr., **23**, 227 (1966).
75. Bapat B. V., Ghatge B. B., Bhattacharyya S. C. J. Chromatogr., **23**, 363 (1966).
76. Bapat B. V., Sankpal T. K., Ghatge B. B., Bhattacharyya S. C. J. Chromatogr., **29**, 333 (1967).
77. Bardychev I. I., Kulikov V. I., Naumovich L. A., Tumysheva T. V. Zh. Anal. Khim., **23**, 1893 (1968).
78. Marcelin G. J. Chromatogr., **174**, 208 (1979).
79. Di Corcia A., Liberti A., Sambucini C., Samperi R. J. Chromatogr., **152**, 63 (1978).
80. Kepner R. E., Maarse H. J. Chromatogr., **66**, 229 (1972).
81. Lawrence B. M., Hogg J. W., Terhune S. J. J. Chromatogr., **50**, 59 (1970).
82. Scheffer J. J. C., Baerheim Svendsen A. J. Chromatogr., **115**, 607 (1975).
83. Scheffer J. J. C., Koedam A., Baerheim Svendsen A. Sci. Pharm., **44**, 119 (1976).
84. Scheffer J. J. C., Koedam A., Schuesler M. T. I. W., Baerheim Svendsen A. Chromatographia, **10**, 669 (1977).
85. Jequier C., Nicollier G., Tabacchi R., Garnero J. Phytochemistry, **19**, 461 (1980).
86. Tressl R., Friese L., Fendesack F., Köppler H. J. Agr. Food Chem., **26**, 1422, 1426 (1978).
87. Clark B. C., Powell C. C., Radford T. Tetrahedron, **33**, 2187 (1977).
88. Ross M. S. F. J. Chromatogr., **106**, 392 (1975).
89. George-Nascimento C., Cori O. Phytochemistry, **10**, 1803 (1971).
90. Chayet L., Rojas C., Cardemil E., Jabalquinto A. M., Vicuña R., Cori O. Arch. Biochem. Biophys., **180**, 318 (1977).
91. Croteau R. Plant Physiol., **59**, 519 (1979).
92. Poulos A. J., Croteau R. Arch. Biochem. Biophys., **187**, 307 (1978).
93. Buttersby A. R., Laing D. G., Ramage R. J. Chem. Soc. (Perkin I), 2743 (1972).
94. Banthorpe D. V., Charlwood B. V., Francis M. J. O. Chem. Rev., **72**, 115 (1972).
95. Croteau R., Burbott A. J., Loomis W. D. Biochem. Biophys. Res. Commun., **50**, 1006 (1973).
96. Bazylchik V. V., Udarov B. G., Polyakova N. P. Zh. Anal. Khim., **31**, 604 (1976).
97. Norin T. Acta Chem. Scand., **16**, 640 (1962).
98. Lawrence B. M., Hogg J. W. Perfum. Essent. Oil Rec., **59**, 515 (1968).
99. McDonald K. L., Carlidge D. M. J. Chromatogr. Sci., **9**, 440 (1971).
100. Herling J., Shabtai J., Gil-Av E. J. Chromatogr., **8**, 349 (1962).
101. Paris C., Alexandre P. J. Chromatogr. Sci., **10**, 402 (1972).
102. Rothbächer H., Suteu F. J. Chromatogr., **100**, 236 (1974).
103. Bournot P., Maume B. F., Baron C. J. Chromatogr., **57**, 55 (1971).
104. Abe I., Musha S. Bunseki Kagaku, **23**, 755 (1974).
105. Sakata I., Koshimizu K. Agr. Biol. Chem., **43**, 411 (1979).
106. Casanova J., Corey E. J. Chem. Ind. (London), 1664 (1961).
107. Croteau R., Karp F. Arch. Biochem. Biophys., **184**, 77 (1977).
108. Nakajima M., Ueno T. Chemistry, **24**, 469 (1969).

109. *Maestas P. D., Morrow C. J.* Tetrahedron Lett., 1047 (1976).
110. *Kugler E., Langlais R., Halang W., Hufschmidt M.* Chromatographia, 8, 468 (1975).
111. *Averill W., March E. W.* Chromatogr. Newsl., 4, 20 (1976).
112. *Wilson C. W., Shaw P. E. J.* Agr. Food Chem., 28, 919 (1980).
113. *Kugler E.* — In: Vorkommen und Analytik ätherischer Öle./Ed. Kubeczka K.-H. Stuttgart: Thieme, 1979, p. 114.
114. *Jennings W. J.* Chromatogr. Sci., 17, 636 (1979).
115. *Hiltunen R., Räisänen S.* Planta Med., 41, 174 (1981).
116. *Dandeneau R., Bente P., Rooney T., Hiskes R.* Amer. Lab., 11, 61 (1979).
117. Anon., Gas Chromatography Applications Notes, GCA-5, CT. Norwalk: Perkin-Elmer.
118. *Smedman L. A., Snajberk K., Zavarin E., Mon T. R.* Phytochemistry, 8, 1471 (1969).
119. *Rooney T. A., Altmayer L. H., Freeman R. R., Zerenner E. H.* Amer. Lab., 11, 81 (1979).
120. *Karawya M. S., Balbaa S. I., Hifnawy M. S. J.* Pharm. Sci., 60, 381 (1971).
121. *Haggag M. Y., Shalaby A., Verzar-Petri G.* Planta Med., 27, 361 (1975).
122. *Kaul V. K., Nigam S. S., Banerjee A. K.* Ind. Perfum., 23, 1 (1979).
123. *Sen A. R., Sardar P. K., Sengupta P. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., 60, 235 (1977).
124. *Baslas P., Baslas R. K.* Ind. Perfum., 22, 125 (1977).
125. *Siddiqui M. S., Mohammad F., Srivastava S. K., Gupta R. K.* Perfum. Flavor., 4, 19 (1979).
126. *Younes M. E., Mokhtar A.* Bull. Chem. Soc. Jap., 47, 2588 (1974).
127. *Thompson A. C., Hedrin P. A., Gueldner R. C., Davis F. M.* Phytochemistry, 13, 2029 (1974).
128. *Banthorpe D. V., Bucknall G. A., Doonan H. J., Doonan S., Rowan M. G.* Phytochemistry, 15, 91 (1976).
129. *Croteau R., Karp F.* Arch. Biochem. Biophys., 176, 734 (1976).
130. *Croteau R., Hooper C. I., Felton M.* Arch. Biochem. Biophys., 188, 182 (1978).
131. *Kubeczka K.-H.* Planta Med., 35, 291 (1979).
132. *Battaille J., Dunning R. L., Loomis W. D.* Biochim. Biophys. Acta, 51, 538 (1961).
133. *Wrolstad R. E., Jennings W. G. J.* Chromatogr., 18, 318 (1965).
134. *Scheffer J. J. C., Koedam A., Baerheim Svendsen A.* Chromatographia, 9, 425 (1976).
135. *von Rudloff E., Couchman F. M.* Can. J. Chem., 42, 1890, (1964).
136. *Lawrence B. M. J.* Chromatogr., 38, 535 (1968).
137. *Meehan T. D., Coscia C. J.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 1043 (1973).
138. *Adcock J. W., Betts T. J. J.* Chromatogr., 34, 411 (1968).
139. *Banthorpe D. V., Turnbull K. W. J.* Chromatogr., 37, 366 (1968).
140. *Croteau R., Felton M., Ronald R. C.* Arch. Biochem. Biophys., 200, 524 (1980).
141. *Prasad R. S., Gupta A. S., Dev S. J.* Chromatogr., 92, 450 (1974).
142. *Croteau R., Johnson M.* unpublished results.
143. *Baines D. A., Jones R. A. J.* Chromatogr., 47, 130 (1970).
144. *Bambagiotti A. M., Vincieri F. F., Cosi G.* Phytochemistry, 11, 1455 (1972).
145. *Shinka T., Ogura K., Seto S. J.* Biochem., 78, 1177 (1975).
146. *Madsen B. C., Latz H. W. J.* Chromatogr., 50, 288 (1970).
147. *Kohli J. C. J.* Chromatogr., 105, 193 (1975).
148. *Kohli J. C. J.* Chromatogr., 121, 116 (1976).
149. *Martinek A. J.* Chromatogr., 56, 338 (1971).

150. Barrett G. C. *Advan. Chromatogr.*, **11**, 145 (1974).
151. Mottl O. — In: *Liquid Chromatography. A Survey of Modern Techniques and Applications*, J. Chromatogr. Library Series. Vol. 3/Eds. Deyl Z., Macek K., Janák J. Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 623.
152. Lawrence B. M., Hogg J. W., Terhune S. J. *Perfum. Essent. Oil Record*, **60**, 88 (1969).
153. Meklati B. Y., Ahmed A. Y. *Riv. Ital.*, **61**, 302 (1979).
154. Jones B. B., Clark B. C., Iacobucci G. A. J. *Chromatogr.*, **178**, 575 (1979).
155. Bergman N. A., Hall B. *Acta Chem. Scand.*, **B33**, 148 (1979).
156. Anon., *Application Highlights*. No. AH 313 (Essential Oils). MA, Framingham: Waters Assoc., 1974.
157. Komae H., Hayashi N. J. *Chromatogr.*, **114**, 258 (1975).
158. Hayashi N., Yamamura Y., Komae H. *Chem. Ind. (London)*, **34** (1977).
159. Ross M. S. F. J. *Chromatogr.*, **160**, 199 (1978).
160. Schwanbeck J. — In: *Vorkommen und Analytik ätherischer Öle*. Stuttgart: Thieme, 1979, p. 72.
161. Siouffi A. M., Traynard J. C., Guiochon G. J. *Chromatogr. Sci.*, **15**, 469 (1977).
162. Bergot B. J., Anderson R. J., Schooley D. A., Henrick C. A. J. *Chromatogr.*, **155**, 97 (1978).
163. Ohloff G., Uhde G., Schulte-Elte K. H. *Helv. Chim. Acta*, **50**, 561 (1967).
164. Dauben W. G. J. *Agr. Food Chem.*, **22**, 156 (1974).
165. Dauben W. G., Hubbell J. P., Vietmeyer N. D. J. *Org. Chem.*, **40**, 479 (1975).
166. Southwell I. A. *Phytochemistry*, **9**, 2243 (1970).
167. Weinheimer A. J., Youngblood W. W., Washecheck P. H., Karns T. K. B., Ciereszko L. S. *Tetrahedron Lett.*, 497 (1970).
168. Pickett J. A., Coates J., Sharpe F. R. *Chem. Ind. (London)*, 571 (1975).
169. Pickett J. A., Sharpe F. R., Peppard T. L. *Chem. Ind. (London)*, 30 (1977).
170. Lukes V., Komers R. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 1598 (1964).
171. Nigam I. C., Levi L. J. *Chromatogr.*, **23**, 217 (1966).
172. Westfelt L. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2829 (1966).
173. Wenninger J. A., Yates R. L. J. *Ass. Offic. Anal. Chem.*, **52**, 1155 (1969).
174. Andersen N. H., Syrdal D. D. *Phytochemistry*, **9**, 1325 (1970).
175. Andersen N. H., Falcone M. S. J. *Chromatogr.*, **44**, 52 (1969).
176. Ikediobi C. O., Hsu I. C., Bamburg J. R., Strong F. M. *Anal. Biochem.*, **43**, 327 (1971).
177. Mori Y., Nakamura M. *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 499 (1971).
178. Hamilton W. D., Park R. J., Perry G. J., Sutherland M. D. *Aust. J. Chem.*, **26**, 375 (1973).
179. Wood G., Huang A. J. *Agr. Food Chem.*, **23**, 239 (1975).
180. Pyysalo H., Sepä E.-L., Widén K.-G. J. *Chromatogr.*, **190**, 466 (1980).
181. Furuya T., Kojima H. J. *Chromatogr.*, **29**, 341 (1967).
182. Heisler E. G., Siciliano J., Bills D. D. J. *Chromatogr.*, **154**, 297 (1978).
183. George-Nascimento C., Pont-Lezica R., Cori O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 119 (1971).
184. Pfiffner A. — In: *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*./Ed. Goodwin T. W. New York: Academic Press, 1971, p. 95.
185. Velasco J., Chandra G. R., Mandava N. J. *Agr. Food Chem.*, **26**, 1061 (1978).
186. Saunders P. F. — In: *Isolation of Plant Growth Substances*./Ed. Hillman J. R. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978, p. 115.
187. Quarrie S. A. *Anal. Biochem.*, **87**, 148 (1978).
188. Hubick K. T., Reid D. M. *Plant Physiol.*, **65**, 523 (1980).
189. Nigam I. C., Levi L. J. *Chromatogr.*, **17**, 466 (1965).

190. Andersen N. H., Falcone M. S., Syrdal D. S. *Phytochemistry*, **9**, 1341 (1970).
191. Maarse H. J. *Chromatogr.*, **106**, 369 (1975).
192. Matsuo A., Uto S., Nakayama M., Hayashi S. *Z. Naturforsch.*, **31**, 401 (1976).
193. Takemoto T., Uchida M., Kusano G. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 531 (1976).
194. Wilson C. W., Shaw P. E. *Phytochemistry*, **17**, 1435 (1978).
195. Fluckiger R., Kato Y., Hishida S. — In: *Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*/Ed. Frigerio A. New York: Raven, 1974, p. 277.
196. Railton I. D., Reid D. M., Gaskin P., MacMillan J. *Planta*, **117**, 179 (1974).
197. Rivier L., Milon H., Pilet P. E. *Planta*, **134**, 23 (1977).
198. Little C. H. A., Heald J. K., Browning G. *Planta*, **139**, 133 (1978).
199. Andersson B., Häggström N., Andersson K. *J. Chromatogr.*, **157**, 303 (1978).
200. Tietz D., Doerffling K., Woehrle D., Erxleben I., Liemann F. *Planta*, **147**, 168 (1979).
201. Adesomoku A. A., Okogun J. I., Ekong D. E., Gaskin P. *Phytochemistry*, **19**, 223 (1980).
202. Jacob G., Cardemil E., Chayet L., Tellez R., Pont-Lezica R., Cori O. *Phytochemistry*, **11**, 1683 (1972).
203. Salveson A., Baerheim Svendsen A. *Planta Med.*, **30**, 93 (1976).
204. Piovetti L., Combaut G., Diara A. *Phytochemistry*, **19**, 2117 (1980).
205. Sofer S. S., Rilling H. C. J. *Lipid Res.*, **10**, 183 (1969).
206. Hayashi S., Matsuo A. *Experientia*, **26**, 347 (1970).
207. Weinges K., Baehi W. *Justus Liebings Ann. Chem.*, **759**, 158 (1972).
208. Bohlmann F., Grenz M., Gupta R. K., Dhar A. K., Ahmed M., King R. M., Robinson H. *Phytochemistry*, **19**, 2391 (1980).
209. Nigam I. C. J. *Pharm. Sci.*, **54**, 1823 (1965).
210. Ward E. W. B., Unwin C. H., Rock G. L., Stoessl A. *Can. J. Bot.*, **54**, 25 (1976).
211. Doskotch R. W., El-Feraly F. S. J. *Pharm. Sci.*, **58**, 877 (1969).
212. Yoshioka H., Mabry T. J., Timmerman B. N. *Sesquiterpene Lactones*, Tokyo: Univ. Tokyo Press, 1973.
213. El-Feraly F. S., Benigni D. A. J. *Nat. Prod.*, **43**, 527 (1980).
214. Asakawa Y., Toyota M., Takemoto T. *Phytochemistry*, **19**, 2141 (1980).
215. Picman A. K., Towers G. H. N., Subba Rao P. V. *Phytochemistry*, **19**, 2206 (1980).
216. Waldner E. E., Schlatter C., Schmid H. *Helv. Chim. Acta*, **52**, 15 (1969).
217. Gupta A. S., Dev S. J. *Chromatogr.*, **12**, 189 (1963).
218. Fenical W., Sims J. J., Wing R. M., Radlick P. C. *Phytochemistry*, **11**, 1161 (1972).
219. Terhune S. J., Hogg J. W., Bromstein A. C., Lawrence B. M. *Can. J. Chem.*, **53**, 3285 (1975).
220. Pliva J., Horak M., Herout V., Sorm F. *Die Terpene, Teil 1, Sesquiterpene*. Berlin: Akademie Verlag, 1960.
221. Doskotch R. W., Hufford C. D. J. *Pharm. Sci.*, **58**, 186 (1969).
222. Anderson L. A. P., de Kock W. T., Nel W., Pachler K. G. R. *Tetrahedron*, **24**, 1687 (1968).
223. Ross M. S. F. J. *Chromatogr.*, **118**, 273 (1976).
224. Daniewski W. M., Kocor M., Krol J. *Roczn. Chem.*, **50**, 2095 (1976).
225. Boyd M. R., Burka L. T., Harris T. M., Wilson B. J. *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 184 (1974).
226. Koreeda M., Weiss G., Nakanishi K. J. *Amer. Chem. Soc.*, **95**, 239 (1973).
227. Hara S., Ohsawa A., Endo J., Sashida Y., Itokawa H. *Anal. Chem.*, **52**, 428 (1980).
228. Warthen J. D., Jr. *J. Liquid Chromatogr.*, **3**, 279 (1980).
229. Houx N. W. H., Voerman S. J. *Chromatogr.*, **129**, 456 (1976).

230. Heath R. R., Tumlinson J. H., Doolittle R. E., Proveaux A. T. J. Chromatogr., Sci., **13**, 380 (1975).
231. Sweetser P. B., Vatuvars A. Anal. Biochem., **71**, 68 (1976).
232. Rapp A., Ziegler A., Bachmann O., Duering H. Chromatographia, **9**, 44 (1976).
233. Reeve D. R., Crozier A. Phytochemistry, **15**, 68 (1976).
234. Cihra A. J., Brenner M. L., Brun W. A. Plant Physiol., **59**, 821 (1977).
235. Cargile N. L., Borchert R., McChesney J. D. Anal. Biochem., **97**, 331 (1979).
236. Eglinton R., Hamilton R. J., Hodges R., Raphael R. A. Chem. Ind. (London), 955 (1959).
237. Shlyakhov A. F., Koreshkova R. I., Telkova M. S. J. Chromatogr., **104**, 337 (1975).
238. Body D. R. Lipids, **12**, 204 (1977).
239. Bower C. L., Rowe J. W. Phytochemistry, **6**, 151 (1967).
240. Norin T., Westfelt L. Acta Chem. Scand., **17**, 1828 (1963).
241. Carman R. M. Aust. J. Chem., **19**, 1535 (1966).
242. Carman R. M., Dennis N. Aust. J. Chem., **20**, 157 (1967).
243. Carman R. M., Dennis N. Aust. J. Chem., **20**, 163 (1967).
244. Aplin R. T., Cambie R. C., Rutledge P. S. Phytochemistry, **2**, 205 (1963).
245. Kates M., Hancock A. J., Ackman R. G. J. Chromatogr., **15**, 177 (1977).
246. Pileire B., Beaune P., Laudat M. H., Cartier P. J. Chromatogr., **182**, 269 (1980).
247. Hudy J. A. Anal. Chem., **31**, 1754 (1959).
248. Enzell C. R., Thomas B. R. Acta Chem. Scand., **19**, 913 (1965).
249. Thomas B. R. Acta Chem. Scand., **20**, 1074 (1966).
250. Nestler F. H. M., Zinkel D. F. Anal. Chem., **39**, 1118 (1967).
251. Zinkel D. F., Lathrop M. B., Zank L. C. J. Gas Chromatogr., **6**, 158 (1968).
252. Zinkel D. F., Zank L. C., Wesolowski M. F. Diterpene Resin Acids — A Compilation of Infrared, Mass, Nuclear Magnetic Resonance, Ultraviolet Spectra and Gas Chromatographic Retention Data. WI. Madison: USDA Forest Service, 1971.
253. Bardyshev I. I., Bulgakov A. N. Kromatogr. Anal. Khim. Drev., 101 (1975).
254. Zinkel D. F., Engler C. C. J. Chromatogr., **136**, 245 (1977).
255. Mori K., Matsui M., Ikekawa N., Sumiki Y. Tetrahedron Lett., 3395 (1966).
256. Valkanas G., Iconomou N. Pharm. Acta Helv., **41**, 209 (1966).
257. Holmbom B., Avela E., Pekkala S. J. Amer. Oil Chem. Soc., **51**, 397 (1974).
258. Holmbom B. J. Amer. Oil Chem. Soc., **54**, 289 (1977).
259. Hasson J. C., Kulkarni M. V. Anal. Chem., **44**, 1586 (1972).
260. Jacob K., Vogt W., Clauss A., Schwertfeger G., Knedel M. — In: Quantitative Mass Spectrometry in Life Sciences II./Eds. De Leenheer A. P., Roncucci R. R., Van Pelegghem C. Amsterdam: Elsevier, 1978, p. 201.
261. Borthwick J., Brooks C. J. W., Reid W. W., Russel R. A. Ann. Tab., **12**, 19 (1975).
262. Takahashi N. Seikagaku, **50**, 184 (1978).
263. Hedden P. Proc. Plant Growth Regul. Work Group, **5**, 33 (1978).
264. Gaskin P., MacMillan J. — In: Isolation of Plant Growth Substances./Ed. Hillman J. R., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978, p. 79.
265. Kuellertz G., Eckert H., Schilling G. Biochem. Physiol. Pflanz., **173**, 186 (1978).
266. Rappaport L., Adams D. Phil. Trans. Roy. Soc., London, **B284**, 521 (1978).
267. Reeve D. R., Crozier A., Durley R. C., Reid D. M., Pharis R. P. Plant Physiol., **55**, 42 (1975).
268. Wample R. L., Durley R. C., Pharis R. P. Physiol. Plant, **35**, 273 (1975).
269. Challen S. B., Kučera M. J. Chromatogr., **32**, 53 (1968).
270. Blechinger F. W. Fette, Seifen, Anstrichm., **72**, 275 (1974).

271. *Ekman R.* Phytochemistry, **19**, 321 (1980).
272. *Nicholas H. J.* Biochim. Biophys. Acta, **84**, 80 (1964).
273. *Ruddat M., Heftmann E., Lang A.* Arch. Biochem. Biophys., **110**, 496 (1965).
274. *Sato A., Ogiso A., Kuwano H.* Phytochemistry, **19**, 2267 (1980).
275. *Bansal R. K., Garcia-Alvarez M. C., Joshi K. C., Rodriguez B., Patni R.* Phytochemistry, **19**, 1979 (1980).
276. *Evans F. J., Schmid R. J., Kinghorn A. D.* Biomed. Mass Spectrom., **2**, 126 (1975).
277. *Hergenbahn M., Adolf W., Hecker E.* Tetrahedron Lett., 1595 (1975).
278. *Fujita T., Masuda I., Takao S., Fujita E.* J. Chem. Soc. (Perkin I), 2098 (1976).
279. *Garcia-Alvarez M. C., Rodriguez B.* Phytochemistry, **19**, 2405 (1980).
280. *Dennis D. T., West C. A. J.* Biol. Chem., **242**, 3293 (1967).
281. *Robinson D. R., West C. A.* Biochemistry, **9**, 70 (1970).
282. *Baxter J. H., Milne G. W.* Biochim. Biophys. Acta, **176**, 265 (1969).
283. *MacMillan J., Suler P.* Nature (London), **197**, 790 (1962).
284. *Paleg L. G.* Ann. Rev. Plant Physiol., **16**, 291 (1965).
285. *Jones K. C.* J. Chromatogr., **52**, 512 (1970).
286. *LePage-Degivry M.-T., Garello G., Isaia A., Barthe P., Bulard C.* Physiol. Veg., **15**, 343 (1977).
287. *Davies L. J., Rappaport L.* Plant Physiol., **55**, 620 (1975).
288. *Heftmann E., Saunders G. A. J.* Liquid Chromatogr., **1**, 333 (1978).
289. *Graebe J. E., Dennis D. T., Upper C. D., West C. A. J.* Biol. Chem., **240**, 1847 (1965).
290. *Benesova V., Benes I., Chau H. M., Herout V.* Collect. Czech. Chem. Commun., **40**, 658 (1975).
291. *Ruedi P., Eugster C. H.* Helv. Chim. Acta, **58**, 1899 (1975).
292. *Herz W., Sharma R. P. J.* Org. Chem., **40**, 192 (1975).
293. *Asakawa Y., Toyota M., Takemoto T.* Phytochemistry, **19**, 1799 (1980).
294. *Okuda T., Yoshida T., Koike S., Toh N.* Phytochemistry, **14**, 509 (1975).
295. *Aasen A. J., Hlubucek J. R., Enzell C. R.* Acta Chem. Scand., **B29**, 589 (1975).
296. *Gafni Y., Shechter I.* Anal. Biochem., **92**, 248 (1979).
297. *Zinkel D. F., Rowe J. W.* Anal. Chem., **36**, 1160 (1964).
298. *Rao G. H. R., Jachimowicz A. A., While J. G. J.* Chromatogr., **96**, 151 (1974).
299. *Trivedi G. K., Kubo I., Kubota T. J.* Chromatogr., **179**, 219 (1979).
300. *Ganijian I., Kubo I., Kubota T. J.* Chromatogr., **200**, 250 (1980).
301. *Bowen D. H., Crozier A., MacMillan J., Reid D. M.* Phytochemistry, **12**, 2935 (1973).
302. *Glenn J. L., Kuo C. C., Durley R. C., Pharis R. P.* Phytochemistry, **11**, 345 (1972).
303. *Reeve D. R., Crozier A.* Phytochemistry, **15**, 791 (1976).
304. *Grübner G., Schneider G., Sembdner G. J.* Chromatogr., **121**, 110 (1976).
305. *Schneider G., Sembdner G., Focke I., Schreiber K.* Phytochemistry, **10**, 3009 (1971).
306. *Powell L. E., Tautvydas K. J.* Nature (London), **213**, 292 (1967).
307. *Carnes M. G., Brenner M. L.* — In: Proc. 8th Int. Conf. Plant Growth Substances./Ed. Andersen C. R. Tokyo, Hirokawa, 1974, p. 99.
308. *Crozier A., Reeve D. R.* — In: Proc. 9th Int. Conf. Plant Growth Substances./Ed. Pilet P. E. Berlin; Springer, 1977, p. 67.
309. *Sweetser P. B.* Proc. Plant Growth Regul. Work. Group, **5**, 1 (1978).
310. *Heftmann E., Saunders G. A., Haddon W. F. J.* Chromatogr., **156**, 71 (1978).
311. *Morris R. O., Zaerr J. B.* Anal. Lett., **11**, 73 (1978).

312. *Reeve D. R., Crozier A.* — In: Isolation of Plant Growth Substances/Ed. Hillman J. R. Cambridge: Cambridge Univ. Press., 1978, p. 41.
313. *Jones M. G., Metzger J. D., Zeevaart J. A. D.* Plant Physiol., **65**, 218 (1980).
314. *Reeve D. R., Yokota T., Nash L. J., Crozier A. J.* Exp. Bot., **27**, 1243 (1976).
315. *Cordell G. A.* Phytochemistry, **13**, 2343 (1974).
316. *Cordell G. A.* Progr. Phytochem., **4**, 209 (1977).
317. *Ikekawa N.* Methods Enzymol., **15**, 200 (1969).
318. *Ohmoto T., Ikuse M., Natori S.* Phytochemistry, **9**, 2137 (1970).
319. *Nordby H. E., Nagy S. J.* Chromatogr., **75**, 187 (1973).
320. *Fokina G. A., Belova N. V.* Khim. Prir. Soedin., **11**, 735 (1975).
321. *Wilkomirski B., Kasprzyk Z. J.* Chromatogr., **103**, 376 (1975).
322. *Ikan R., Gottlieb R.* Isr. J. Chem., **8**, 685 (1970).
323. *Itoh T., Uetsuki T., Tamura T., Matsumoto T.* Lipids, **15**, 407 (1980).
324. *Pym J. G., Ray J. E., Smith G. W., Whitehead E. V.* Anal. Chem., **47**, 1617 (1975).
325. *Gallegos E. J.* Anal. Chem., **47**, 1524 (1975).
326. *Tsuda Y., Isobe K., Fukushima S., Ageta H., Iwata K.* Tetrahedron Lett., **23** (1967).
327. *Lisboa B. P.* Methods Enzymol., **15**, 3 (1969).
328. *Ikan R., Kashman J., Bergmann E. D. J.* Chromatogr., **14**, 275 (1964).
329. *Anding C., Brandt R. D., Ourisson G.* Eur. J. Biochem., **24**, 259 (1971).
330. *Qureshi A. A., Beytia E., Porter J. W.* J. Biol. Chem., **248**, 1848 (1973).
331. *Tschesche R., Lampert F., Snatzke G. J.* Chromatogr., **5**, 217 (1961).
332. *Zieliński J., Konopa J. J.* Chromatogr., **36**, 540 (1968).
333. *Kasprzyk Z., Pyrek J.* Phytochemistry, **7**, 1631 (1968).
334. *Ikan R., J.* Chromatogr., **17**, 591 (1965).
335. *Fischer F., Hertel R. J.* Chromatogr., **38**, 274 (1968).
336. *Lindgren B. O., Svahn C. M.* Acta Chem. Scand., **20**, 1763 (1966).
337. *Osman A. M., Younes M. E.-G., Ata F. M.* Bull. Chem. Soc. (Japan), **47**, 2056 (1974).
338. *Gestetner B. J.* Chromatogr., **13**, 259 (1964).
339. *Schabert J. C., Potgieter D. J. J.* J. Chromatogr., **31**, 235 (1969).
340. *Severson R. F., Ellington J. J., Arrendale R. F., Snook M. E. J.* Chromatogr., **160**, 155 (1978).
341. *Betancor C., Freire R., Gonzalez A. G., Salazar J. A., Pascard C., Prange T.* Phytochemistry, **19**, 1989 (1980).
342. *Lawrie W., McLean J., Younes M. E.-G.* Chem. Ind. (London), 1720 (1966).
343. *Rizvi S. H., Shoeb A., Kapil R. S., Popli S. P.* Phytochemistry, **19**, 2409 (1980).
344. *Kang S. S., Woo W. S. J.* Nat. Prod., **43**, 510 (1980).
345. *Mulholland D. A., Taylor D. A. H.* Phytochemistry, **19**, 2421 (1980).
346. *Seifert K., Budzikiewicz H., Schreiber K.* Pharmazie, **31**, 81 (1976).
347. *Fisher J. F. J.* Agr. Food Chem., **23**, 1199 (1975).
348. *Amagaya S., Ogihara Y.* Shoyaku Zasshi, **33**, 166 (1979).
349. *Heftmann E., Lundin R. E., Haddon W. F., Peri I., Mor U., Bondi A. J.* Nat. Prod., **42**, 410 (1979).
350. *Smith S. L., Jorgenson J. W., Novotný M. J.* Chromatogr., **187**, 111 (1980).
351. *Lin J.-T., Nes W. D., Heftmann E. J.* Chromatogr., **207**, 457 (1981).
352. *Fisher J. F. J.* Agr. Food Chem., **26**, 497 (1978).
353. *Hajbrahim S. K., Tibbets P. J. C., Watts C. D., Maxwell J. R., Eglinton G., Colin H., Guiochon G.* Anal. Chem., **50**, 549 (1978).
354. *Paanakker J. E., Hallegraef G. M.* Comp. Biochem. Physiol., **60B**, 51 (1978).
355. *Iriyama K., Yoshiura M., Shiraki M. J.* Chromatogr., **154**, 302 (1978).

356. *Abaychi J. K., Riley J. P.* Anal. Chim. Acta, **107**, 1 (1979).
357. *DeJong D. W., Woodlief W. G.* J. Agr. Food Chem., **26**, 1281 (1978).
358. *Calabro G., Micali G., Curro P.* Essenze Deriv. Agrum., **48**, 359 (1978).
359. *Braumann T., Grimme L. H.* J. Chromatogr., **170**, 264 (1979).
360. *Puglisi C., de Silva J. A. F. J.* Chromatogr., **120**, 457 (1976).
361. *Zakaria M., Simpson K., Brown P. R., Kristulovic A. J.* Chromatogr., **176**, 109 (1979).
362. *Pfander H., Shurtenberger H., Meyer V. R.* Chimia, **34**, 179 (1980).
363. *Fiksdahl A., Mortensen J. T., Liaaen-Jensen S.* J. Chromatogr., **157**, 111 (1978).
364. *Pfander H., Haller F., Levenberger F. J., Thommen H.* Chromatographia, **9**, 630 (1976).
365. *Suzuki T., Hasegawa K.* Agr. Biol. Chem., **38**, 871 (1974).
366. *Hasegawa K.* Methods Enzymol., **67**, 261 (1980).
367. *Wieckowski S., Droba M.* Plant Sci. Lett., **13**, 397 (1978).
368. *Gimeno A. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **63**, 653 (1980).
369. *Baloch A. K., Buckle K. A., Edwards R. A. J.* Chromatogr., **139**, 149 (1977).
370. *Buckle K. A., Rahman F. M. M.* J. Chromatogr., **171**, 385 (1979).
371. *Piasecki M.* Roczn. Akad. Poln. Poznaniu, **89**, 125 (1976).
372. *Siklosi-Rajki E., Farago L.* Acta Aliment. Acad. Sci. Hung., **3**, 389 (1974).
373. *Petrović S. M., Kolarov L. A., Perišić-Janjić N. U.* J. Chromatogr., **171**, 522 (1979).
374. *McKone H. T.* J. Chem. Educ., **56**, 676 (1979).
375. *Csorba I., Buzás Z., Polyák B., Boross L.* J. Chromatogr., **172**, 287 (1979).
376. *Shirak M., Yoshiura M., Iriyama K.* Chem. Lett., 103 (1978).
377. *Washuetl J.* Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr., **23**, 369 (1974).
378. *Thielemann H. Z.* Anal. Chem., **271**, 285 (1974).
379. *Sherma J., Latta M. J.* Chromatogr., **154**, 73 (1978).
380. *Cross J.* Chromatographia, **13**, 572 (1980).
381. *Taylor R. F., Davies B. H.* J. Chromatogr., **103**, 327 (1975).
382. *Taylor R. F.* Methods Enzymol., **67**, 233 (1980).
383. *Hemming F. W.* — In: Biochemistry of Lipids. MTP Intern. Rev. Sci. Vol. 4./Ed. Goodwin T. W. London: Butterworths, 1974, p. 39.
384. *Waechter C. J., Lennarz W. J.* Ann. Rev. Biochem., **45**, 95 (1976).
385. *Hemming F. W.* Phil. Trans. Roy. Soc. London, **B284**, 559 (1978).
386. *Hemming F. W.* — In: Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid./Ed. Goodwin T. W. New York: Academic Press, 1970, p. 105.
387. *Lindgren B. O.* Acta Chem. Scand., **19**, 1317 (1965).
388. *Wellburn A. R., Hemming F. W.* J. Chromatogr., **23**, 51 (1968).
389. *Durr I. F., Habbal M. Z.* Biochem. J., **127**, 345 (1972).
390. *Stone K. J., Hemming F. W.* Biochem. J., **104**, 43 (1967).
391. *DeLuca L., Rosso G., Wolf G.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**, 615 (1970).
392. *Frot-Coutaz J. P., Silverman-Jones C. S., DeLuca L. M.* J. Lipid Res., **17**, 200 (1976).
393. *Sagami H., Ogura K., Seto S.* Biochemistry, **16**, 4616 (1977).
394. *Dunphy P. J., Kerr J. D., Pennock J. F., Whittle K. J., Feeney J.* Biochim. Biophys. Acta, **136**, 136 (1967).
395. *Wellburn A. R., Stevenson J., Hemming F. W., Morton R. A.* Biochem. J., **102**, 313 (1967).
396. *Suga T., Shishibori T., Nakaya K.* Phytochemistry, **19**, 2327 (1980).
397. *Gough D. P., Kirby A. L., Richards J. B., Hemming F. W.* Biochem. J., **118**, 167 (1970).
398. *Allen C. M., Keenan M. V., Sack J.* Arch. Biochem. Biophys., **175**, 236 (1976).
399. *Sasak W., Chojnacki T.* Arch. Biochem. Biophys., **181**, 402 (1977).

400. *Baba T., Allen C. M.* Biochemistry, **17**, 5598 (1978).
401. *Hannus K., Pensar G.* Phytochemistry, **13**, 2563 (1974).
402. *Beedle A. S., Walton M. J., Goodwin T. W.* Insect Biochem., **5**, 465 (1975).
403. *Stone K. J., Wellburn A. R., Hemming F. W., Pennock J. F.* Biochem. J., **102**, 325 (1967).
404. *Sasak W., Mankowski T., Chojnacki T., Daniewski W. M.* FEBS Lett., **64**, 55 (1976).
405. *Jankowski W., Mankowski T., Chojnacki T.* Acta Biochim. Polon., **22**, 67 (1975).
406. *Chojnacki T., Jankowski W., Mankowski T., Sasak W.* Anal. Biochem., **69**, 114 (1975).
407. *Freeman D. J., Rupar C. A., Carrol K. K.* Lipids **15**, 191 (1980).
408. *Skilleter D. N., Kekwick R. G.* Anal. Biochem., **20**, 171 (1967).
409. *Goldman R., Strominger J. L.* J. Biol. Chem., **247**, 5116 (1972).
410. *Parodi A., Behrens N. H., Leloir L. F., Dankert M.* Biochim. Biophys. Acta, **270**, 529 (1972).
411. *Pont-Lezica R., Brett C. T., Martinez P. R., Dankert M. A.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **66**, 980 (1975).
412. *Dugan R. E., Rasson E., Porter J. W.* Anal. Biochem., **22**, 249 (1968).
413. *Garcia-Peregrin E., Suarez M. D., Aragon M. C., Mayor F.* Phytochemistry, **11**, 2495 (1972).
414. *Davies B. H., Rees A. F., Taylor R. F.* Phytochemistry, **14**, 717 (1975).
415. *Scher M., Lennarz W. J., Sweely C. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **59**, 1313 (1968).
416. *Tkacz J. S., Hercovic A., Warren C. D., Jeanloz R. W.* J. Biol. Chem., **249**, 6372 (1974).
417. *DeLuca L. M., Frot-Coutaz J. P., Silverman-Jones C. S., Roller P. R.* J. Biol. Chem., **252**, 2575 (1977).
418. *Kushwaha S. C., Kates M., Renaud R. L., Sudden R. E.* Lipids, **13**, 352 (1978).
419. *Frot-Coutaz J. P., DeLuca L. M.* Biochem. J., **159**, 799 (1976).
420. *Sagami H., Ogura K., Seto S.* Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 572 (1978).
421. *Behrens N. H., Leloir L. F.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **66**, 153 (1970).
422. *Stone K., Strominger J. L.* J. Biol. Chem., **247**, 5107 (1972).
423. *Barr R. M., Hemming F. W.* Biochem. J., **126**, 1203 (1972).
424. *Grough D. P., Hemming F. W.* Biochem. J., **117**, 309 (1970).
425. *Keenan M. V., Allen C. M.* Arch. Biochem. Biophys., **161**, 375 (1974).
426. *Pleiningner H., Immer H.* Chem. Ber., **98**, 414 (1965).
427. *Cornforth R. H., Popják G.* Methods Enzymol., **15**, 359 (1969).
428. *Lahov M., Chin T. H., Lennarz W. J.* J. Biol. Chem., **244**, 5890 (1969).
429. *Upper C. D., West C. A.* J. Biol. Chem., **242**, 3285 (1967).
430. *Laskovics F. M., Poulter C. D.* Biochemistry, **20**, 1893 (1981).
431. *Bloch K., Chaykin S., Phillips A. H., DeWaard A. J.* Biol. Chem., **234**, 2595 (1959).
432. *Suzue G., Orihara K., Morishita H., Tanaka S.* Radioisotope, **13**, 300 (1964).
433. *Valenzuela P., Beytia E., Cori O., Yudelevich A.* Arch. Biochem. Biophys., **113**, 536 (1966).
434. *Logan D. M. J.* Lipid Res., **13**, 137 (1972).
435. *Epstein W. W., Rilling H. C.* J. Biol. Chem., **245**, 4597 (1970).
436. *Tidd B. K. J.* Chem. Soc. B., 1168 (1971).
437. *Dankert M. A., Wright A., Kelley W. S., Robbins P. W.* Arch. Biochem. Biophys., **116**, 425 (1966).
438. *Uematsu T., Suhadolnik R. J.* J. Chromatogr., **123**, 347 (1976).
439. *Bhat P. V., DeLuca L. M., Wind M. L.* Anal. Biochem., **102**, 243 (1980).

440. Fukuda T., Nakamura T., Ohashi S. J. Chromatogr., **128**, 212 (1976).
441. Del Campo G., Puente J., Valenzuela M. A., Traverso-Cori A., Cori O. Biochem. J., **167**, 525 (1977).
442. Bobbitt J. M., Segebarth K.-P. — In: Cyclopentanoid Terpene Derivatives./ Eds. Taylor W. I., Battersby A. R. New York: Dekker, 1969, p. 1.
443. Sticher O., Junod-Busch V. Pharm. Acta Helv., **50**, 127 (1975).
444. Chandel R. S., Rastogi R. P. Phytochemistry, **19**, 1889 (1980).
445. Coscia C. J., Botta L., Guarnaccia R. Arch. Biochem. Biophys., **136**, 498 (1970).
446. Sakata I., Mitsui T. Agr. Biol. Chem., **39**, 1329 (1975).
447. Sticher O., Weisflog A. Pharm. Acta Helv., **50**, 394 (1975).
448. Bianco A., Guiso M., Iavarone C., Trogolo C. Gazz. Chim. Ital., **105**, 175, 185, 195 (1975).
449. Takeda Y., Nishimura H., Inouye H. Chem. Pharm. Bull., **24**, 1216 (1976).
450. Kinast G., Tietze L.-F. Chem. Ber., **109**, 3640 (1976).
451. Martinelli E. M. Eur. J. Mass Spectrom. Biochem. Med. Environ. Res., **1**, 33 (1980).
452. Inouye H., Uobe K., Hiral M., Masada Y., Hashimoto K. J. Chromatogr., **118**, 201 (1976).
453. Furoya T. J. Chromatogr., **18**, 152 (1965).
454. Coscia C. J., Guarnaccia R., Botta L. Biochemistry, **8**, 5036 (1969).
455. Schneider G., Jänicke S., Sembdner G. J. Chromatogr., **109**, 409 (1975).
456. Inouye H., Ueda S., Aoki Y., Takeda Y. Chem. Pharm. Bull., **20**, 1287 (1972).
457. Banthorpe D. V., Mann J. Phytochemistry, **11**, 2589 (1971).
458. Croteau R., Martinkus C. Plant Physiol., **64**, 169 (1979).
459. Schreiber K., Wieland J., Sembdner G. Tetrahedron, **25**, 5541 (1969).
460. Wojciechowsky Z. A. Phytochemistry, **14**, 1749 (1975).
461. Francis G. W., Hertzberg S., Andersen K., Liaaen-Jensen S. Phytochemistry, **9**, 629 (1968).
462. Mankowski T., Sasak W., Janczura E., Chojnacki T. Arch. Biochem. Biophys., **181**, 393 (1977).
463. Kerr A. K. A., Hemming F. W. Eur. J. Biochem., **83**, 581 (1978).
464. Yamamori S., Murazumi N., Araki Y., Ito E. J. Biol. Chem., **253**, 6516 (1978).
465. Tshesche R., Ciper F., Breitmaier E. Chem. Ber., **110**, 3111 (1977).
466. Meier B., Sticher O. J. Chromatogr., **138**, 453 (1977).
467. Hasegawa S., Hirose Y. Phytochemistry, **19**, 2479 (1980).
468. Sakakibara J., Shirai N. Phytochemistry, **19**, 2159 (1980).
469. Yamaguchi I., Yokota T., Yoshida S., Takahashi N. Phytochemistry, **18**, 1699 (1979).
470. Chen S. E., Staba E. J. Lloydia, **41**, 361 (1978).
471. Erni F., Frei R. W. J. Chromatogr., **149**, 561 (1978).
472. Erni F., Frei R. W. J. Chromatogr., **130**, 169 (1977).
473. Abegaz B., Tecle B. Phytochemistry, **19**, 1553 (1980).
474. Tripathi R. D., Tiwari K. P. Phytochemistry, **19**, 2163 (1980).
475. Tiwari K. P., Srivastava S. D., Srivastava S. K. Phytochemistry, **19**, 980 (1980).
476. Kitagawa I., Im K. S., Yosioka I. Chem. Pharm. Bull., **24**, 1260 (1976).
477. Yahara S., Tanaka O., Komori T. Chem. Pharm. Bull., **24**, 2204 (1976).
478. Shany S., Gestetner B., Birk Y., Bondi A., Kirson I. Isr. J. Chem., **10**, 881 (1972).
479. Jankowski W., Mankowski T., Chojnacki T. Biochim. Biophys. Acta, **337**, 153 (1974).
480. Zatta P. Experientia, **32**, 693 (1976).
481. Forsee W. T., Elbein A. D. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., **73**, 2574 (1976).
482. Kean E. L. J. Biol. Chem., **252**, 5622 (1977).

483. Keeman R. W., Kruczek M., Fusinato L. Arch. Biochem. Biophys., **167**, 697 (1975).
484. Wieffering J. H. Phytochemistry, **5**, 1053 (1966).
485. Waechter C. J., Kennedy J. L., Harford J. B. Arch. Biochem. Biophys., **174**, 726 (1976).
486. Peterson P. A., Rask L., Helting T., Ostberg L., Fernstedt Y. J. Biol. Chem., **251**, 4986 (1976).
487. Daleo G. R., Pont-Lezica R. FEBS Lett., **74**, 247 (1977).
488. Danielson T. J., Hawes E. M., Bliss C. A. J. Chromatogr., **103**, 216 (1975).
489. Battersby A. R., Burnett A. R., Parsons P. G. J. Chem. Soc., C, 1187 (1969).
490. Inouye H., Ueda S., Nakamura Y. Chem. Pharm. Bull., **18**, 1856 (1970).
491. Weinges K., Kloss P., Henkels W. Justus Liebig's Ann. Chem., **759**, 173 (1972).
492. Hostettmann K., Hostettmann-Kaldas M., Sticher O. J. Chromatogr., **186**, 529 (1979).
493. Hostettmann K., Hostettmann-Kaldas M., Nakanishi K. J. Chromatogr., **170**, 355 (1979).
494. Hostettmann K., Hostettmann M., Sticher O. Helv. Chim. Acta, **62**, 2079 (1979).
495. Kawai K., Akiyama T., Ogihara Y., Shibata S. Phytochemistry, **13**, 2829 (1974).
496. Yahara S., Kasai R., Tanaka O. Chem. Pharm. Bull., **25**, 2041 (1977).
497. Kawai K., Shibata S. Phytochemistry, **17**, 287 (1978).
498. Ishii H., Tori K., Tozoy T., Yoshimura Y. Chem. Pharm. Bull., **26**, 674 (1978).
499. Ogihara Y., Inoue O., Otsuka H., Kawai K.-I., Tanimura T., Shibata S. J. Chromatogr., **128**, 218 (1978).
500. Groenendijk G. W. T., Jansen P., Bonting S., Daemen F. Methods Enzymol., **67**, 203 (1980).
501. McCormick A., Napoli J., DeLuca H. Methods Enzymol., **67**, 220 (1980).
502. Arnaboldi M., Motto M., Tsujimoto K., Balogh-Nair V., Nakanishi K. J. Amer. Chem. Soc., **101**, 7082 (1979).
503. Adams M. A., Nakanishi K. J. Liquid Chromatogr., **2**, 1097 (1979).
504. Takashima Y., Nakajima T., Tanaka S., Washitake M., Anmo T., Matsu-maru H. Chem. Pharm. Bull., **27**, 1553 (1979).
505. Groenendijk G. W. T., de Grip W., Daemen F. Anal. Biochem., **99**, 304 (1979).
506. Pařizková H., Blatná J. Chromatogr., **191**, 301 (1980).
507. Fung Y. K., Rahwan G. R., Sams R. A. J. Chromatogr., **147**, 528 (1978).
508. Dunagin P., Olson J. Methods Enzymol., **15**, 289 (1969).
509. Chiang T.-C. J. Chromatogr., **182**, 335 (1980).
510. Reeder S., Park G. L. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **58**, 595 (1975).
511. Mariani A., Guanitiolini R. Bull. Chim. Farm., **114**, 626 (1975).
512. Dennison D. B., Kirk J. R. J. Food Sci., **42**, 1376 (1972).
513. Paanakker J. E., Groenendijk G. W. T. J. Chromatogr., **168**, 125 (1979).
514. Egberk D., Heroff J., Potter R. J. Agr. Food Chem., **25**, 1127 (1977).
515. De Ruyter M., De Leenheer A. Clin. Chem., **22**, 1593 (1976).
516. Tsukida K., Kodama A., Ito M. J. Nutr. Sci. Vitaminol., **24**, 593 (1978).
517. Macleod I., Wiggins A. Proc. Anal. Div. Chem. Soc., **15**, 329 (1978).
518. Roberts A., Nichols M., Frolik C., Newton D., Sporn M. Cancer Res., **38**, 3327 (1978).
519. DeLeenheer A. P., De Bevere V. O. R. C., De Ruyter M. G. M., Claeys A. E. J. Chromatogr., **162**, 408 (1979).
520. De Ruyter M., De Leenheer A. Clin. Chem., **24**, 1920 (1978).
521. Kwok R., Hudson T., Subramanian S. Appl. HPLC Meth. Det. Fat. Sol.

- Vitam. A, D, E, K Food Pharm., Symp. Proc., Assoc. Vitam. Chem., Chicago, IL, 1978, p. 34.
522. *Rose W. P.* Appl. HPLC Meth. Det. Fat. Sol. Vitam. A, D, E, K Foods Pharm., Symp. Proc., Chicago: Assoc. Vitam. Chem., 1978, p. 109.
 523. *Bui-Nguyen M.-H., Blanc B.* Experientia, **36**, 374 (1980).
 524. *Soderhjeld P., Andersson B. J.* Sci. Food Agr., **29**, 697 (1978).
 525. *Henderson S., Wickroski A.* Appl. HPLC Meth. Det. Fat. Sol. Vitam. A, D, E, K Foods Pharm., Symp. Proc. IL. Chicago: Assoc. Vitam. Chem., 1978, p. 48.
 526. *McKenzie R. M., Hellwege D. M., McGregor M. L., Rockley N. L., Riquetti P. J., Nelson E. C. J.* Chromatogr., **155**, 379 (1978).
 527. *De Ruyter M., De Leenheer A.* Anal. Chem., **51**, 43 (1979).
 528. *Eriksson M., Eriksson T., Sorensen B.* Acta Pharm. Suecica, **15**, 274 (1978).
 529. *Groenendijk G., de Grip W., Daemen F.* Biochim. Biophys. Acta, **617**, 430 (1980).
 530. *Frolík C., Tavela T., Sporn M. J.* Lipid Res., **19**, 32 (1978).
 531. *Frolík C., Tavela T., Peck G., Sporn M.* Anal. Biochem., **86**, 743 (1978).
 532. *Puglisi C., de Silva J. A. F. J.* Chromatogr., **152**, 421 (1978).
 533. *Halley B. A., Nelson E. C. J.* Chromatogr., **175**, 113 (1979).
 534. *Aitzelmueller K., Pilz J., Tasche R.* Fette, Seifen, Anstrichm., **81**, 40 (1979).
 535. *Fankel R.* Mikrochim. Acta, **1**, 359 (1978).
 536. *Hänni R., Hervouet D., Busslinger A. J.* Chromatogr., **162**, 615 (1979).
 537. *Thompson J., Maxwell W. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 766 (1977).
 538. *Tsukida K., Kodama A., Ito M. J.* Chromatogr., **134**, 331 (1977).
 539. *Tsukida K., Kodama A., Ito M., Kawamoto M. J.* Nutr. Sci. Vitaminol., **23**, 263 (1977).
 540. *Rotmans J., Kropf A.* Vision Res., **15**, 1301 (1975).
 541. *Tsukida K., Masahara R., Ito M. J.* Chromatogr., **192**, 395 (1980).
 542. *Barnett S., Frick L.* Anal. Chem., **51**, 641 (1979).
 543. *McCormick A., Napoli J., DeLuca H.* Anal. Biochem., **86**, 25 (1978).
 544. *Landen W., Eitenmiller R. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **62**, 283 (1979).
 545. *Landen W. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **63**, 131 (1980).
 546. *Holasová M., Blatná J. J.* Chromatogr., **123**, 225 (1976).
 547. *Ito Y., Zile M., Ahrens H., DeLuca H. J.* Lipid Res., **15**, 517 (1974).
 548. *Maruyama T., Ushigusa T., Kanematus H., Niiya I., Imamura M.* Shokuhin Eiseigaku Zasshi, **18**, 487 (1977).
 549. *Bieri J. C., Poukka R. K. H., Prival E. L. J.* Lipid Res., **11**, 118 (1970).
 550. *Ames S. R. J.* Ass. Offic. Anal. Chem., **54**, 1 (1971).
 551. *Bunnel R. H.* Lipids, **6**, 245 (1971).
 552. *Sheppard A. J., Prosser A. R., Hubbard W. D. J.* Amer. Oil. Chem. Soc., **49**, 619 (1972).
 553. *Stillman R., Ma T. S.* Mikrochim. Acta, 641 (1974).
 554. *Christie A. A.* Chem. Ind. (London), 492 (1975).
 555. *Davidek J.* — In: Liquid Column Chromatography. A Survey of Modern Techniques and Applications./Eds. Deyl Z., Macek K., Janák J. J. Chromatogr. Library Series, Vol. 3. Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 953.
 556. *Thompson J. N.* Appl. HPLC Meth. Det. Fat. Sol. Vitam. A, D, E, K Foods Pharm., Symp. Proc. IL, Chicago: Assoc. Vitam. Chem., 1978, p. 62.
 557. *Wiggins R. A.* — In: Proc. 4th Kellogg Nutr. Symp./Ed. Taylor T. G. MTP Int. Rev. Sci. Lancaster: Butterworths, 1979, p. 73.
 558. *Aratani T., Asakawa Y., Touchstone J. C.* — In: Tocopherols./Ed. Sherma J. New York: Wiley, 1979, p. 695.
 559. *Cheralambous G.* (Editor). Liquid Chromatographic Analysis of Foods and Beverages. New York: Academic Press, 1979.
 560. *Gogolewski M., Nogala M., Luczynski A.* Rocz. Akad. Roln. Poznaniu, **89**, 59 (1976).
 561. *Toulova M.* Acta Vet., **44**, 163 (1975).

562. Koleva M., Dzhoneidi M., Budevski O. *Pharmazie*, **30**, 168 (1975).
563. Mueller-Mulot W. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **53**, 732 (1976).
564. Thielemann H. *Sci. Pharm.*, **42**, 221 (1974).
565. Dompert W. V., Beringer H. *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **78**, 108 (1976).
566. Ball G. F. M., Ratcliff P. W. J. *Food Technol.*, **13**, 433 (1978).
567. Hess J., Pallansch M., Harich K., Bunce G. E. *Anal. Biochem.*, **83**, 401 (1977).
568. Luan N.-T., Pokorný J., Čoupek J., Pokorný S. J. *Chromatogr.*, **130**, 378 (1977).
569. Perisic-Janjic N., Petrovic S., Hadzic P. *Chromatographia*, **9**, 130 (1976).
570. Strong J. W. J. *Pharm. Sci.*, **65**, 968 (1976).
571. Ueda F., Higashi T., Ayukawa Y. *Vitamins*, **48**, 439 (1974).
572. Mordret F., Laurent A. M. *Rev. Fr. Corps Gras.*, **25**, 245 (1978).
573. Chiarotti M., Giusti G. V. J. *Chromatogr.*, **147**, 481 (1978).
574. Meijboom P. W., Jongenotter G. A. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **56**, 33 (1979).
575. Feeter D. K. J. *Amer. Oil Chem. Soc.*, **51**, 184 (1974).
576. Sheppard P. E., Stutsman M. J. J. *Soc. Cosmet. Chem.*, **28**, 115 (1977).
577. Sheppard A. J., Hubbard W. D. J. *Pharm. Sci.*, **68**, 98 (1979).
578. Lehman J. *Lipids*, **13**, 616 (1978).
579. Lehman J. *Lipids*, **15**, 135 (1980).
580. De Leenheer A. P., De Bevere V. O., Cruyl A. A., Clayes A. E. *Clin. Chem.*, **24**, 585 (1978).
581. Lin S.-N., Horning E. C. J. *Chromatogr.*, **112**, 465 (1975).
582. De Vries J. W., Egberg D. C., Heroff J. C. — In: *Liquid Chromatographic Analysis of Foods and Beverages*. Vol. 2./Ed. Charalambous G. New York: Academic Press, 1979 p. 477.
583. Rueckemann O. H., Ranfft K. Z. *Lebensm.-Unters. Forsch.*, **166**, 151 (1978).
584. Pickston L. N. Z. J. *Sci.*, **21**, 383 (1978).
585. Abe K., Katsui G. *Vitamins*, **49**, 259 (1975).
586. Widicus W., Kirk J. R. J. *Ass. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 637 (1979).
587. Abe K., Ohmae M., Kawabe K., Katsui G. *Vitamins*, **53**, 385 (1979).
588. De Leenheer A. P., De Bevere V. O., Claeyes A. E. *Clin. Chem.*, **25**, 425 (1979).
589. Vatasery G. T., Hagen D. F. *Anal. Biochem.*, **79**, 129 (1977).
590. Tangney C. C., Driskell J. A., Apfell J. A., McNair H. M. *VIA, Varian Instr. Appl.*, **13**, 14 (1979).
591. Tangney C. C., Driskell J. A., McNair H. M. J. *Chromatogr.*, **172**, 513 (1979).
592. Thompson J. N., Hatina G., Maxwell W. B. *Appl. HPLC Meth. Det. Fat. Sol. Vitam. A, D, E, K Foods Pharm.*, IL. Chicago: Assoc. Vit. Chem., 1978, p. 84.
593. Abe K., Yuguchi Y., Katsui G. J. *Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 183 (1975).
594. Jansson L., Nilsson B., Lindgren R. J. *Chromatogr.*, **181**, 242 (1980).
595. Hatam L., Kayden H. J. J. *Lipid Res.*, **20**, 639 (1979).
596. Eriksson T., Sorensen B. *Acta Pharm. Suecica*, **14**, 475 (1977).
597. Vatasery G. T., Maynard V. R., Hagen D. F. J. *Chromatogr.*, **161**, 299 (1978).
598. Cohen H., Lapointe M. J. *Agr. Food Chem.*, **26**, 1210 (1978).
599. Bieri J. G., Tolliver T., Catignani G. L. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **32**, 2143 (1979).
600. McMurray C. H., Blanchflower W. J. J. *Chromatogr.*, **178**, 525 (1979).
601. Nilsson B., Johansson B., Jansson L., Holmberg L. J. *Chromatogr.*, **145**, 169 (1978).
602. Cavins J. F., Inglett G. E. *Cereal Chem.*, **51**, 605 (1974).
603. Suttie J. W. — In: *Handbook of Lipid Research*. Vol. 1./Ed. Draper H. H. New York: Plenum Press, 1978, p. 211.

- 604. *Mee J. M. L., Brooks C. C., Yanagihara K. H. J. Chromatogr., 110, 178 (1975).*
- 605. *Nakata Y., Mita Y., Khono S. Yakugaku Zasshi, 96, 53 (1976).*
- 606. *Silvi C. L., Ionedu T. Rev. Microbiol., 8, 39 (1977).*
- 607. *Ruttich B., Krska M., Simek M., Coupek J. Roczn. Nauk. Zootech., 5, 33 (1978).*
- 608. *Donnahey P. L., Burt V. T., Rees H. H., Pennock J. F. J. Chromatogr., 170, 272 (1979).*
- 609. *Collins M. D., Shah H. N., Minnikin D. E. J. Appl. Bacteriol., 48, 277 (1980).*
- 610. *Mack D. O. J. Liquid Chromatogr., 3, 1005 (1980).*
- 611. *Thompson J. N., Hatina G., Maxwell W. B. Trace Org. Anal.: New Front Anal. Chem., NBS Spec. Publ., No. 519, 279 (1979).*
- 612. *Lefevere M. F., De Leenheer A. P., Clayes A. E. J. Chromatogr., 186, 749 (1979).*
- 613. *Yamano Y., Ikenoya S., Tsuda T., Ohmae M. Yakugaku Zasshi, 97, 486 (1977).*
- 614. *Yamano Y., Ikenoya S., Anze M., Ohmae M., Kawaba K. Yakugaku Zasshi, 98, 774 (1978).*
- 615. *Hiroshima O., Abe K., Ikenoya S., Ohmae M., Wawabe K. Yakugaku Zasshi, 99, 1007 (1979).*
- 616. *Barnett S. A., Frick L. W., Baine H. M. Anal. Chem., 52, 610 (1980).*
- 617. *Sheaver M. J., Allan V., Haroon Y., Barkhan P. — In: Proc. 8th Steenbock Symp./Ed. Suite J. W. MD. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 317.*

Глава 6

Стероиды

Эрих Хефтман

6.1. Введение

Поскольку в 1976 г. уже была опубликована книга по хроматографии стероидов [1], обсуждать здесь работы, появившиеся в печати за период с 1964 по 1975 г., нецелесообразно. Вместо этого хотелось бы уделить особое внимание высокоэффективной жидкостной хроматографии, сравнительно недавно пополнившей арсенал инструментальных методов исследования, и ограничиться лишь кратким рассмотрением остальных методов хроматографии. Ссылки на ряд более ранних публикаций можно найти в книге [1], а также в обзорах, посвященных хроматографии стероидов [2—4] *. Поведение стереоизомерных стероидов в условиях жидкостной хроматографии рассмотрено в работе [5].

В настоящее время исследование стероидов при помощи бумажной хроматографии почти не проводится, лишь в нескольких особых случаях этот метод используется для разделения очень полярных конъюгатов стероидов. Для быстрого сравнения анализируемых образцов со стандартными препаратами по-прежнему прибегают к ТСХ [6], однако этот метод за последнее время практически не претерпел никаких изменений. Возможность его применения для количественного анализа и определения изотопномеченных соединений весьма ограничена [7]. В силу того что стероиды являются неионными соединениями, для их разделения непригодны методы ионообменной хроматографии и электрофореза.

Итак, осталось только сказать несколько слов о методах газовой и жидкостной колоночной хроматографии. Колоночная хроматография стероидов рассмотрена в обзоре [8]. В обзорах [9, 10] описаны методы анализа этих соединений с помощью гель-хроматографии и газовой хроматографии в сочетании с хроматомасс-спектрометрией. В статье Нустрёма и Съёвалла

* В дополнение к этой обзорной литературе следует привести также книгу: Гёрёк Ш. Количественный анализ стероидов. Пер. с англ. — М.: Мир, 1985. — Прим. ред.

[11] суммированы данные, полученные этими исследователями при изучении разделения стероидов на липофильном сефадексе, а Вестергард [12] представил краткий обзор своих работ по хроматографии стероидов на различных колонках. ВЭЖХ стероидов посвящены книга [13] и обзор [14]. Соответствующая информация содержится также в обзоре [15]. Ссылки на обзоры, касающиеся более узких вопросов хроматографии стероидов, будут приведены в последующих разделах.

6.2. Стерины

Этот раздел посвящен собственно стеринам, т. е. соединениям, в состав молекул которых входит лишь один атом кислорода. Секостерины рассмотрены в разд. 5.3, а более полярные гормоны линьки насекомых — в разд. 5.11. Стерины и особенно их эфиры с трудом поддаются разделению, поскольку этот класс стероидов включает гомологи (от C_{26} до C_{30}) и стереоизомеры, различающиеся конфигурацией при C-3, C-5 и C-24, а также конфигурацией $\Delta^{24(28)}$ -двойной связи (двойная связь при C-22 обычно имеет *транс*-конфигурацию).

Методы хроматографии стеринов рассмотрены в обзоре [16], а их денситометрический анализ — в обзоре [17]. Опубликованы также статьи обзорного характера, посвященные газовой хроматографии холестерина и его предшественников [18] и растительных стеринов [19]. Статьи, в которых рассматривается жидкостная хроматография липидов, содержат также информацию о разделении этим методом стеринов [20, 21].

Изомерные стерины плохо разделяются с помощью ТСХ на большинстве типов силикагелевых пластинок. Обнаружено, однако, что пластинки В обладают необычной разрешающей способностью и в режиме непрерывного элюирования на них можно разделить, например, ацетаты кампестерина и 5-эргостенола [22]. Сликовский и Каспи [23] ввели весьма полезное усовершенствование в методику приготовления пропитанных раствором нитрата серебра тонкослойных пластинок, предназначенных для фракционирования ненасыщенных стеринов. Нельсон и Нательсон [24] предложили проводить обнаружение холестерина и его эфиров в виде галогенпроизводных, которые легче поддаются окрашиванию. Согласно данным работы [25], высокоэффективная ТСХ позволяет оценивать количество холестерина в крови при его содержании в образце на уровне нескольких нанограммов.

Газохроматографическое разделение свободных стеринов лучше проводить на фенилметилсиликонах типа OV-17 и OV-25, а не на менее полярных фазах UCCW-982 и SE-30 (табл. 6.1)

Таблица 6.1. Относительные времена удерживания стероидов [26] и их триметилсилиловых эфиров [27]

Стероиды	Время удерживания стерина/время удерживания холестерина											
	свободные стеринны ^а				триметилсилиловые эфиры ^б							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Холестерин	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5 α -Холестанол	1,01	1,01	1,00	1,00	1,07	1,05	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95
4-Холестенол	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6-Холестенол	0,99	0,99	1,01	1,01	0,99	1,01	0,99	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01
7-Холестенол	1,11	1,12	1,17	1,18	1,12	1,13	1,12	1,17	1,20	1,22	1,23	1,20
14-Холестенол	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	1,00	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
5,7-Холестадиенол	—	—	—	—	1,10	1,09	1,08	1,14	1,17	1,16	1,27	1,22
Десмостерин	1,07	1,08	1,19	1,24	1,08	1,08	1,08	1,28	1,29	1,30	1,31	1,33
Кампестерин	1,26	1,29	1,30	1,28	1,33	1,28	1,29	1,30	1,30	1,31	1,30	1,29
5 α -Кампестанол	1,27	1,30	1,30	1,28	1,40	1,33	1,30	1,30	1,30	1,31	1,31	1,23
7-Кампестенол	1,40	1,43	1,52	1,50	1,48	1,48	1,45	1,52	1,55	1,58	1,60	1,56
7-Эргостенол	1,40	1,43	1,52	1,50	1,48	1,48	1,45	1,52	1,55	1,58	1,60	1,56
8-Эргостенол	1,25	1,27	1,30	1,31	1,33	1,35	1,34	1,35	1,37	1,33	1,37	1,34
8(14)-Эргостенол	—	—	—	—	1,31	1,24	1,27	1,31	1,34	1,25	1,35	1,26
14-Эргостенол	1,25	1,29	1,29	1,27	1,32	1,28	1,28	1,29	1,29	1,30	1,29	1,28
22-Эргостенол	1,12	1,15	1,14	1,12	—	—	—	—	—	—	—	—
24-Метилхолестерин	1,10	1,12	1,12	1,35	1,31	1,26	1,26	1,39	1,41	1,43	1,45	1,44
Брассикастерин	—	—	—	—	1,11	1,09	1,12	1,12	1,12	1,10	1,10	1,11
5,7-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,47	1,41	1,40	1,51	1,55	1,65	1,68	1,56
7,9-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,40	1,39	1,39	1,49	1,54	1,55	1,60	1,56
7,14-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,34	1,33	1,31	1,39	1,44	1,46	1,51	1,51
8,14-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,31	1,32	1,31	1,39	1,44	1,46	1,47	1,49
7,22-Эргостадиенол	1,23	1,24	1,33	1,32	1,25	1,27	1,26	1,33	1,36	1,36	1,38	1,36
8(14),22-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,09	1,05	1,10	1,13	1,16	1,04	1,15	1,08
14,22-Эргостадиенол	—	—	—	—	1,07	1,10	1,12	1,11	1,11	1,10	1,11	1,10
Эргостерин	1,18	1,21	1,32	1,35	1,24	1,20	1,21	1,32	1,36	1,43	1,49	1,47
7,9(11),22-Эргостатриенол	1,17	1,18	1,31	1,33	1,17	1,19	1,20	1,31	1,35	1,33	1,40	1,36
Ситостерин	1,52	1,60	1,60	1,54	1,63	1,56	1,60	1,60	1,61	1,59	1,57	1,56

Продолжение табл. 6.1

Стерины	Время удерживания стерина/время удерживания холестерина											
	свободные стерины ^а				триметилсинильные эфиры ^б							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
5 α -Стигмастанол	1,54	1,63	1,60	1,54	1,75	1,62	1,60	1,60	1,61	1,59	1,57	1,48
7-Стигмастенол	1,68	1,79	1,86	1,81	1,81	1,80	1,79	1,87	1,91	1,91	1,93	1,90
8(14)-Стигмастенол	—	—	—	—	1,59	1,50	1,57	1,61	1,51	1,51	1,62	1,51
14-Стигмастенол	—	—	—	—	1,62	1,56	1,59	1,59	1,60	1,58	1,56	1,55
Стигмастерин	1,35	1,40	1,40	1,38	1,37	1,34	1,40	1,40	1,41	1,36	1,36	1,36
5,7-Стигмастадиенол	—	—	—	—	1,78	1,73	1,75	1,85	1,90	1,98	2,02	1,90
7,9(11)-Стигмастадиенол	1,61	1,71	1,82	1,79	1,73	1,71	1,71	1,81	1,86	1,85	1,91	1,89
7,14-Стигмастадиенол	1,57	1,67	1,73	1,73	1,68	1,62	1,63	1,71	1,78	1,77	1,83	1,82
8,14-Стигмастадиенол	—	—	—	—	1,64	1,61	1,63	1,71	1,78	1,77	1,79	1,76
14,22-Стигмастадиенол	—	—	—	—	1,38	1,38	1,40	1,40	1,41	1,36	1,36	1,35
7,22-Стигмастадиенол	1,49	1,57	1,65	1,62	1,55	1,58	1,60	1,67	1,69	1,68	1,72	1,73
5,25-Стигмастадиенол	—	—	—	—	1,55	1,48	1,54	1,64	1,67	1,67	1,70	1,68
7,25-Стигмастадиенол	—	—	—	—	1,72	1,72	1,73	1,90	1,96	2,02	2,06	2,04
7,29-Стигмастадиенол	1,80	1,93	2,19	2,25	1,98	1,96	1,93	2,16	2,19	2,22	2,27	2,24
5,24(28)E-Стигмастадиенол	1,53	1,61	1,68	1,68	1,65	1,58	1,61	1,70	1,76	1,74	1,74	1,76
5,24(28)Z-Стигмастадиенол	1,55	1,65	1,77	1,76	1,68	1,61	1,65	1,75	1,84	1,83	1,83	1,86
7,24(28)Z-Стигмастадиенол	1,72	1,84	2,04	2,06	1,86	1,85	1,85	2,04	2,13	2,17	2,19	2,20
5,7,22-Стигмастатриенол	1,44	1,50	1,63	1,63	—	—	—	—	—	—	—	—
5,22,25-Стигмастатриенол	—	—	—	—	1,40	1,28	1,35	1,48	1,53	1,55	1,56	1,55
7,22,25-Стигмастатриенол	—	—	—	—	1,58	1,52	1,56	1,80	1,85	1,87	1,92	1,92
Ланостерин	1,53	1,62	1,68	1,71	1,60	1,53	1,55	1,57	1,66	1,54	1,62	1,52
24-Дигидроланостерин	1,44	1,48	1,40	1,37	1,49	1,39	1,40	1,31	1,31	1,19	1,24	1,14

^а Колонка: стеклянная, 3 м×3 мм (внутр. диаметр); носитель: диатопорт (I) или супелкопорт (II—IV), размер частиц 80—100 меш; подвижная фаза: 3:8% UCCW-982 (I) или 3% SE-30 (II), OV-17 (III), OV-25 (IV); температура колонки 265 °C.

^б Колонка: стеклянная, 3,5 м×4 мм (внутр. диаметр); сорбент: 2% фазы на хромсорбе WAW (VI) или 3% фазы на хромсорбе WDMCS (V, VII—XII), размер частиц 80—100 меш; ниже указаны неподвижные фазы и (в скобках) температура колонки (°C): V — QF-1 (225), VI — дексил 300 (285), VII — SE-30 (253), VIII — OV-17 (265), IX — OV-25 (260), X — HI-EFF-8BP (238), XI — силар 5CP (240), XII — SP-100 (240).

[26]. Остальное время удерживания стеринов одного гомологического ряда возрастает с увеличением числа атомов углерода в молекуле: $C_{27} < C_{28} < C_{29}$. Влияние двойных связей на хроматографические характеристики зависит от их локализации в молекуле. Ацетилирование стеринов приводит к увеличению относительного времени их удерживания на всех четырех неподвижных фазах, приведенных в табл. 6.1, а триметилсилилирование — либо к увеличению (фазы UCCW-982 и SE-30), либо к уменьшению (фазы OV-17 и OV-25) относительного времени удерживания.

Обычно для газохроматографического анализа предпочтительнее использовать не свободные стеринны, а их триметилсилиловые эфиры или другие производные, поскольку в модифицированных стеринах ярче проявляются их стереохимические различия и отвечающие им хроматографические пики более симметричны. В табл. 6.1 представлены значения отношений времени удерживания триметилсилиловых эфиров к времени удерживания триметилсилилхолестерина. Обычно производные стеринов одного гомологического ряда хорошо разделяются, причем относительное время их удерживания возрастает с увеличением молекулярной массы. Наличие двойных связей, особенно при C-7 и C-24, как правило, приводит к увеличению относительного времени удерживания, однако этот эффект, как и при разделении свободных стеринов, зависит от локализации этих связей в молекуле и от природы неподвижной фазы. В частности, насыщенные стеринны и их Δ^5 -аналоги близки по своим хроматографическим свойствам, поэтому их разделение представляет собой трудную задачу, а введение двойной связи при C-22 всегда приводит к уменьшению относительного времени удерживания.

Изучено также поведение продуктов аутоокисления и метаболизма холестерина в различных условиях ГЖХ [28]. Показано, что эфиры холестерина и жирных кислот можно анализировать как таковые, т. е. без предварительного гидролиза, на колонках с цианосилоксаном силар 10С [29] или на колонках с поли-S-179 в режиме программирования температуры [30].

Полезным методом модификации гидроксилсодержащих стероидов является их превращение в кетопроизводные под действием холестериноксидазы [31], в результате которого многие стеринны приобретают свойства, необходимые для их разделения с помощью газовой хроматографии [32]. 4-Метил- и 4,4-диметилстеринны можно анализировать на колонках с OV-17 или OF-1 как в свободной форме [33], так и в виде их ацетатов [34]. Значения ΔR_{Ac} , т. е. отношения времен удержания стерил-ацетатов и соответствующих незащищенных стеринов на колонке, содержащей 1,5% OV-17, уменьшаются в ряду: 4-деметил-

стерины >4 -мометилстерины $>4,4$ -диметилстерины. В такой же последовательности убывают величины отношения времен удерживания 3-оксипроизводных и соответствующих стеринов ($\Delta R_{\text{оксо}}$) на колонке, содержащей 1,5% OF-1, причем среди всех 4-деметилстеринов наибольшие значения $\Delta R_{\text{оксо}}$ характерны для 4-деметил- Δ^5 -стеринов [35].

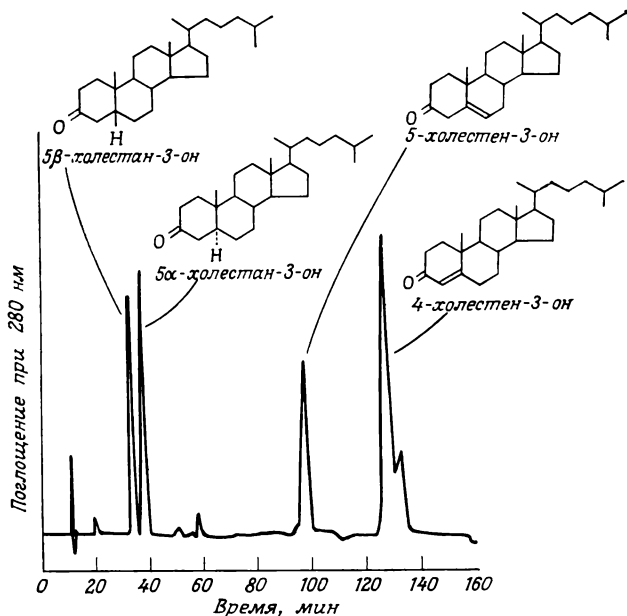


Рис. 6.7. Разделение изомерных 3-оксо- C_{27} -стеринов методом ВЭЖХ [46] (с разрешения авторов).

Колонка: 61 см×6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: лихросорб Si-60-10; подвижная фаза: дихлорметан — н-гексан — этилацетат (94 : 5 : 1); скорость потока: 9,5 мл/мин; давление: 3,79 МПа; шкала детектора: 0,16 оптич. ед.; шкала самописца: 20 мВ; скорость ленты: 6 см/ч.

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией представляет собой чрезвычайно ценный метод анализа сложных смесей стеринов [36]. Для такого рода работы пригодны термостабильные и селективные неподвижные фазы, например PZ-176 [37] и углеводород C_{37} [38]. Стекланные капиллярные колонки обеспечивают высокое разрешение [38, 39], а более точного отнесения даже неразрешенных хроматографических пиков можно добиться путем компьютерной обработки повторно снятых масс-спектров [40]. Весьма специфическая картина фрагментации стеринов [41] и использование изотопномеченных внутренних стандартов позволяют надежно идентифицировать анализируемые соединения [42].

Среди методов жидкостной колоночной хроматографии следует упомянуть два: выделение стерина из воды на колонках, заполненных смолой амберлит XAD-2 [43], являющееся важным этапом контроля степени загрязнения сточных вод, и метод препаративного выделения стерина из смеси неомыляемых веществ животного происхождения на колонках с липофильными гелями [44, 45].

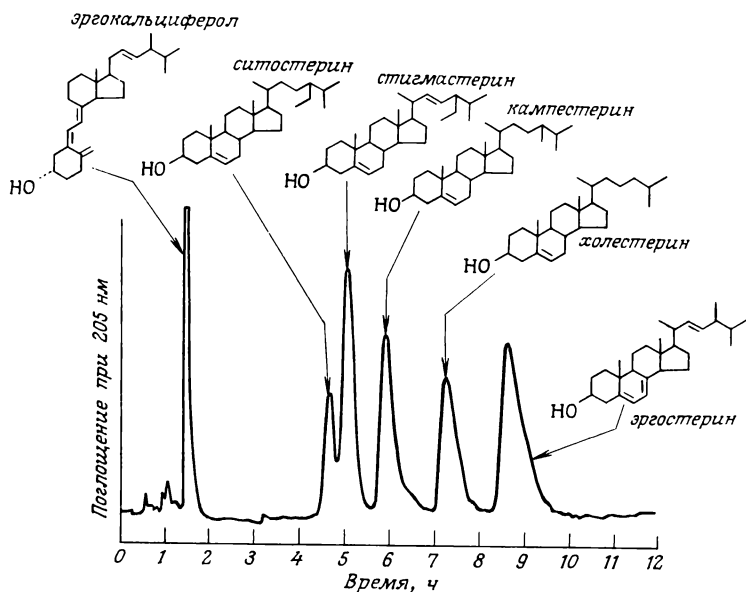


Рис. 6.2. Разделение C_{27} , C_{28} - и C_{29} -стерина методом ВЭЖХ [55] (с разрешения авторов).

Колонка: 2,87 м × 3,7 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: бондапак C_{18} — порасил В, размер частиц 37—75 мкм; подвижная фаза: 0,5%-ный раствор пропанола-2 в н-гексане; скорость потока: 0,4 мл/мин; давление: 1,31 МПа.

Для разделения смесей стерина были использованы различные приемы ВЭЖХ. Высокой разрешающей способностью обладает адсорбционная хроматография на силикагеле, которую проводят в режиме изократического [46—48], градиентного [49] или рециклического элюирования [50]. С помощью этого метода были разделены изомерные 3-оксостерина [46], эпокси-производные [49], ацетаты стерина [47, 48] и эпимеры 26-оксистерина [50]. На рис. 6.1 показан пример простейшего подхода к разделению стерина, т. е. хроматографии в изократическом режиме. Как следует из приведенной на рисунке хроматограммы, холестан-3-он с *цис*-сочленением колец А и В элюируется раньше *транс*-изомера, а наличие в молекуле двойной

связи, особенно если она сопряжена с кетогруппой, приводит к увеличению времени удерживания. Эффективного разделения ацетатов и бензоатов ненасыщенных стеринаов можно достичь также на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле [51] или оксиде алюминия [52].

Обращенно-фазовую распределительную хроматографию применяют для разделения как свободных стеринаов [48, 53], так и их сложных эфиров [54]. Обычно смеси хроматографируют на колонках с μ -бондапаком C_{18} , причем наилучшие результаты дает элюирование безводными органическими растворителями [55, 56]. На рис. 6.2 приведена хроматограмма смеси стеринаов одного гомологического ряда, показывающая, что время их удерживания на обращенной фазе возрастает с уменьшением числа углеродных атомов в молекуле, а при одинаковом числе этих атомов — с увеличением степени ненасыщенности.

6.3. Витамины D

Поскольку витамины D чувствительны к воздействию света, нагревания и кислорода воздуха и претерпевают превращения при взаимодействии с сильными адсорбентами, хроматографическое разделение этих соединений оказалось более сложной задачей, чем разделение их стероидных предшественников. Наиболее удовлетворительные методы анализа соединений этой группы основаны на использовании колоночной хроматографии. Высокий коэффициент молярного поглощения витаминов D облегчает их обнаружение с помощью УФ-детекторов. Известно несколько случаев применения гидрофобной гель-хроматографии для фракционирования этих витаминов [57, 58], однако наилучшее разделение было достигнуто с помощью ВЭЖХ. Сравнение ВЭЖХ и метода, представляющего собой сочетание ТСХ и ГЖХ, показало, что ВЭЖХ позволяет не только быстрее и легче, но и точнее определить количество витамина D_2 [59]. Результаты, полученные с помощью ВЭЖХ, согласуются с данными общепринятых в настоящее время методов химического и биологического анализа, регламентированных Ассоциацией служащих химиков-аналитиков, и поэтому предлагается использовать ВЭЖХ в качестве стандартного метода определения витаминов D [60, 61].

Эффективного разделения метаболитов витаминов D и продуктов их фотоизомеризации можно достичь на колонках с силикагелем. В частности, с колонки, содержащей зорбакс SIL, 2,5%-ным раствором пропанола-2 в скеллисолюве В эти соединения элюируются в последовательности: смесь D_2 и D_3 , 24-окси- D_2 , 24-окси- D_3 , 25-окси- D_2 , 25-окси- D_3 [62]. В этих условиях

витамины D_2 и D_3 в отличие от их оксипроизводных не разделяются. Если же увеличить концентрацию пропанола-2 до 10%, то окси- и диоксиметаболиты будут элюироваться в следующей последовательности: D_3 , 25-окси- D_3 , 24,25-диокси- D_3 , 1 α -окси- D_3 , 25,26-диокси- D_2 , 25,26-диокси- D_3 , 1 α ,25-диокси- D_2 , 1 α ,25-диокси- D_3 .

На рис. 6.3 представлена хроматограмма метаболитов витамина D_3 , полученная при разделении смеси на колонке с зор-

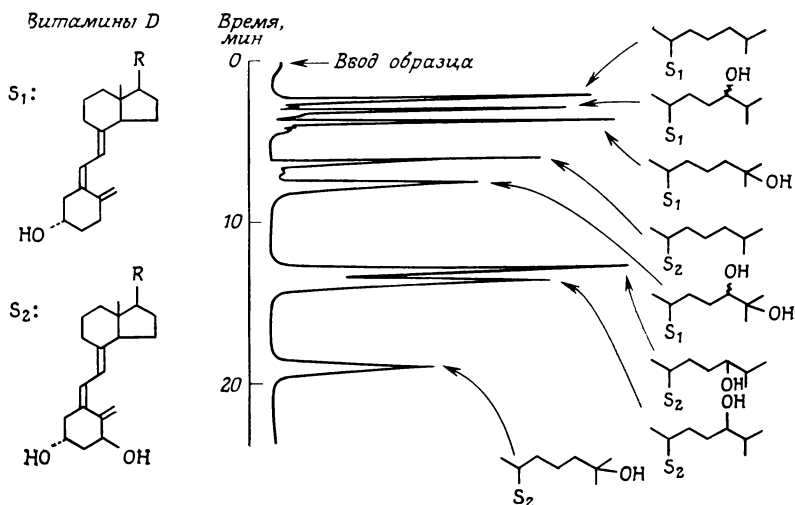


Рис. 6.3. Разделение метаболитов витамина D_3 и их аналогов с помощью ВЭЖХ [63] (с разрешения авторов).

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс SIL; подвижная фаза: 2%-ный раствор метанола в дихлорметане; скорость потока: 0,4–0,42 мл/мин; давление: 8,82 МПа; обнаружение по поглощению при 254 нм. Справа изображены углеводородные цепи, слева — структуры радикалов S_1 и S_2 (место присоединения цепи обозначено буквой R). Первый пик отвечает витамину D_3 , а последний — его 1 α ,25-диоксипроизводному.

баксом SIL в системе метанол — дихлорметан (1:49) [63]. В указанных условиях ни эпимерные 24-оксипроизводные витамина D_3 , ни эпимерные 24,25-диоксипроизводные не разделяются, однако 1 α ,24 α -диокси- D_3 достаточно хорошо отделяется от 1 α ,24 β -эпимера. Влияние оксигрупп на полярность производных витамина D_3 усиливается в ряду: 24-окси- D_3 < 25-окси- D_3 < 1 α -окси- D_3 < 24,25-диокси- D_3 < 1,24-диокси- D_3 < 1,25-диокси- D_3 < 1,24,25-триокси- D_3 .

Возможности ВЭЖХ и ее высокая разрешающая способность проиллюстрированы на примерах разделения продуктов фотоизомеризации витаминов D [64–66] и отделения витамина D_2 от витамина D_3 [67, 68]. Примером практического применения

этого метода может служить определение витаминов D и их метаболитов в крови [58, 69—71], молоке [72, 73], яичном белке [74], тканях животных [75], фармацевтических препаратах [76, 77] и животных кормах [78, 79].

6.4. Сапогенины и алкалоиды

Некоторые стероидные сапогенины представляют собой структурные аналоги алкалоидов, обнаруженных в тех же самых растениях, и обладают аналогичными хроматографическими свойствами. Соединения, различающиеся конфигурацией в месте сочленения колец А и В либо природой, либо числом кислородсодержащих функциональных групп, сравнительно легко поддаются разделению. Однако разделение 5α - и Δ^5 -аналогов сопряжено со значительными трудностями, а существо-

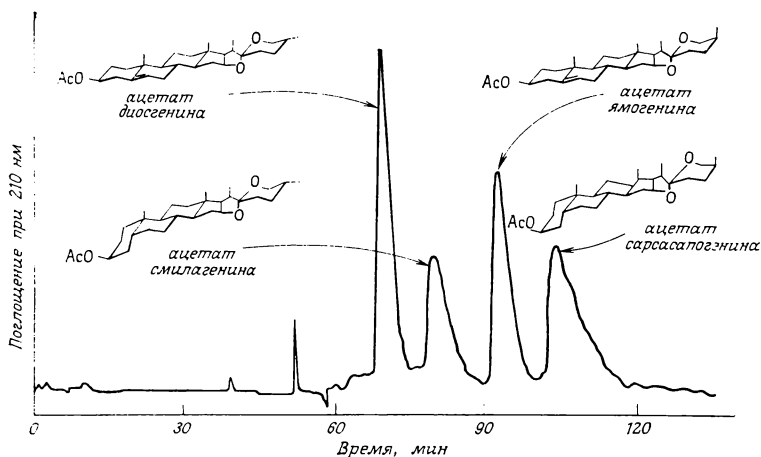


Рис. 6.4. Разделение ацетатов сапогенинов методом ВЭЖХ [80] (с разрешения авторов).

Колонка: 100×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс SIL; подвижная фаза: 1%-ный раствор ацетона в н-гексане; скорость потока: 2 мл/мин; давление: 22,1 МПа.

вание изомеров, различающихся конфигурацией при C-22 и C-25, осложняет выделение соответствующих индивидуальных агликонов из экстрактов растений. При работе на аналитическом уровне обычно вполне удовлетворительные результаты можно получить с помощью ТСХ [5], а для выделения этих растительных стероидов в препаративном масштабе идеальным образом подходит ВЭЖХ.

На рис. 6.4 показано разделение двух пар сапогенинацетатов, являющихся эписмерами при C-5 и C-25, с помощью адсорб-

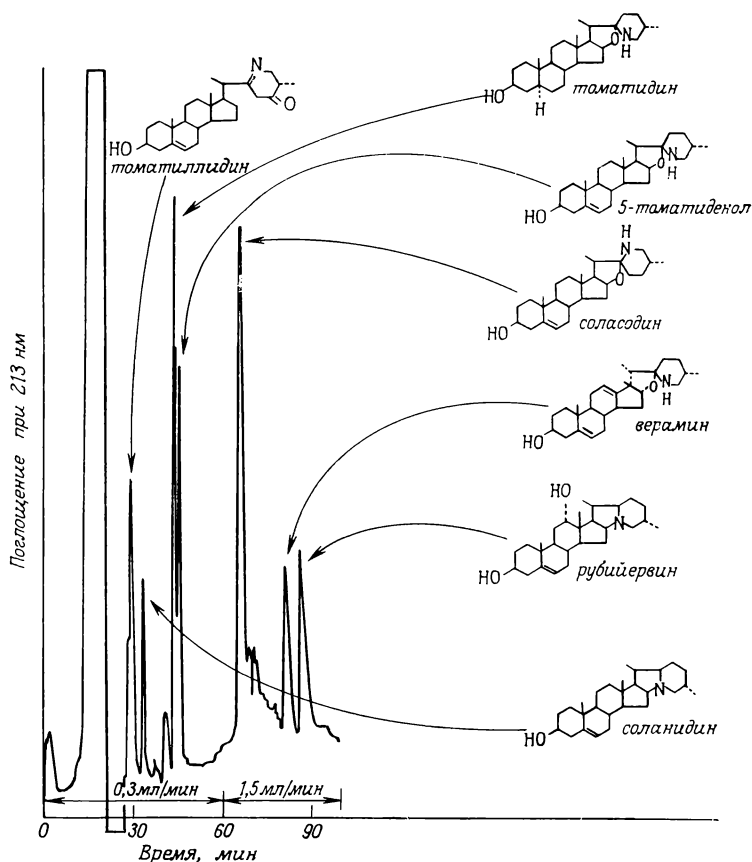


Рис. 6.5. Разделение стероидных алкалоидов методом ВЭЖХ [85].

Колонка: 500×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс SIL; подвижная фаза: *n*-гексан — метанол — ацетон (18 : 1 : 1); скорость потока: 0,3 мл/мин в течение 1 ч, затем 1,5 мл/мин; давление: 5,52 МПа; шкала детектора: 0,2 оптич. ед.; шкала самописца: 10 мВ; скорость ленты: 6 см/ч.

ционной хроматографии. Как следует из рисунка, 25 α -сапогенины элюируются раньше 25 β -эпимеров, а Δ^5 -соединения — раньше своих насыщенных 5 β -аналогов. На рисунке не показаны 5 α -сапогенины — тигогенин и неотигенин, которые имеют такие же конформации, как и соответственно диосгенин и ямогенин, и не отделяются от последних в указанных в подписи к рисунку условиях. Разделить эти соединения удалось при помощи гидрофобной адсорбционной хроматографии на зорбаксе ODS в системе ацетонитрил — *n*-гексан — тетрагидрофу-

ран (17:2:1). В каждом случае ацетаты Δ^5 -сапогенинов элюировались раньше 5α -аналогов.

ТСХ по-прежнему применяют для анализа гликоалкалоидов [81—83], однако ее начинает вытеснять ВЭЖХ [84]. Недавно предложенный модифицированный вариант разработанного авторами главы метода ВЭЖХ, предназначенный для анализа стероидных алкалоидов [85], показал, что разрешающая способность колонок и скорость анализа увеличиваются, если колонки заполняются мелкодисперсным адсорбентом. На таких колонках можно не только разделить 22-эпимеры 5-томатиденол и соласодин, но и отделить Δ^5 -стероид 5-томатиденол от его насыщенного 5α -аналога томатидина (см. рис. 6.5). В описанном примере скорость потока элюента увеличивали через 1 ч после введения образца. Разделение смеси более полярных алкалоидов из *Veratrum* было осуществлено на такой же колонке, но при еще более высокой скорости потока. Разработаны также методы количественного определения стероидных алкалоидов с использованием ВЭЖХ [86] и центрифужной хроматографии в сочетании с ВЭЖХ [87].

6.5. Производные эстрана

Характерной особенностью эстрогенов является наличие в их молекулах фенольного ядра А, которое благоприятствует обнаружению этих соединений по их поглощению в УФ-области или в виде производных. Так, например, специфический и чувствительный метод обнаружения эстрогенов на тонкослойных пластинках основан на реакции азосочетания [88—90]. Кроме того, присутствие фенольной группы способствует взаимодействию этих соединений с амберлитом XAD-2 [91], DEAE-сефадексом [92, 93], сефадексом LH-20 [94] и с системами, используемыми в жидко-жидкостной ион-парной хроматографии [95, 96].

Разделение при помощи ВЭЖХ проводится на различных сорбентах: ЕТН-пермафазе (химически связанном простом эфире) [97] и силикагеле [98, 99] (адсорбционная хроматография), сорбентах с привитыми октадецилсилильными остатками, например партисиле-10 ODS [98], зорбаксе ODS [100], μ -бондапаке C_{18} [99, 101], лихросорбе RP-8-10A [102] и зорбаксе BP-ODS [103] (обращенно-фазовая распределительная хроматография свободных эстрогенов). На рис. 6.6 показана хроматограмма, полученная при разделении эстрогенов с помощью обращенно-фазовой распределительной хроматографии. Как и следовало ожидать, 17-кетопроизводные менее полярны, чем 17-оксистероиды, а полярность триолов выше, чем диолов. Данная хроматографическая система позволяет также разделять эстрогены в соответствии со степенью их ненасыщенности, однако по

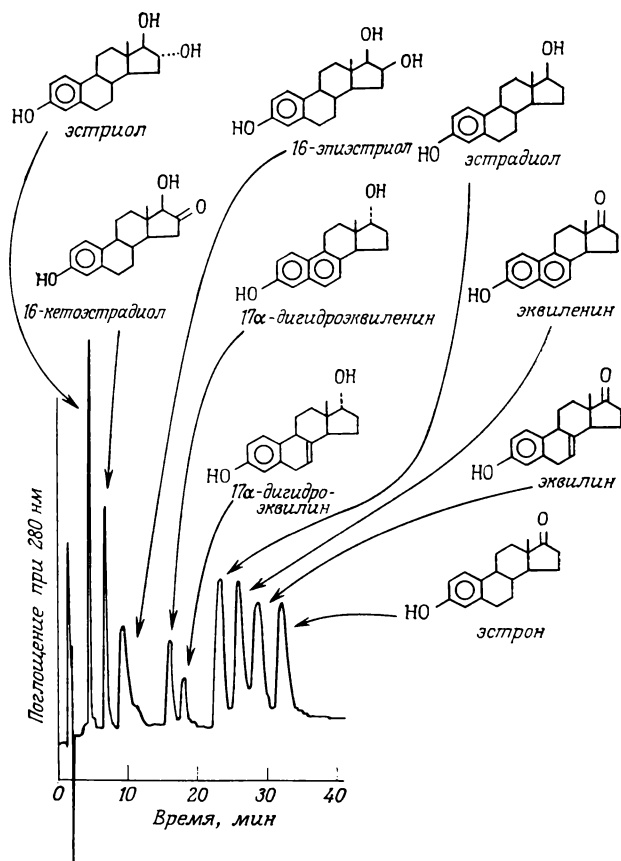


Рис. 6.6. Разделение эстрогенов методом ВЭЖХ [103].

Колонка: 250×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ВР-ОДС; подвижная фаза: 35%-ный водный ацетонитрил; скорость потока: 2 мл/мин; давление: 4,84 МПа.

отношению к эпимерам более высокой разрешающей способностью обладает адсорбционная хроматография [103]. В любой паре эпимерных 17-оксисоединений более полярным является β-эпимер.

Чувствительность метода ВЭЖХ существенно возрастает при использовании электрохимического детектора [104]. Например, предел обнаружения эстриола составляет 1 нг. Если же эстрогены хроматографировать в виде флуоресцирующих дансилпроизводных, то предел обнаружения уменьшается более чем на порядок и для эстрадиола составляет менее 0,05 нг [105, 106].

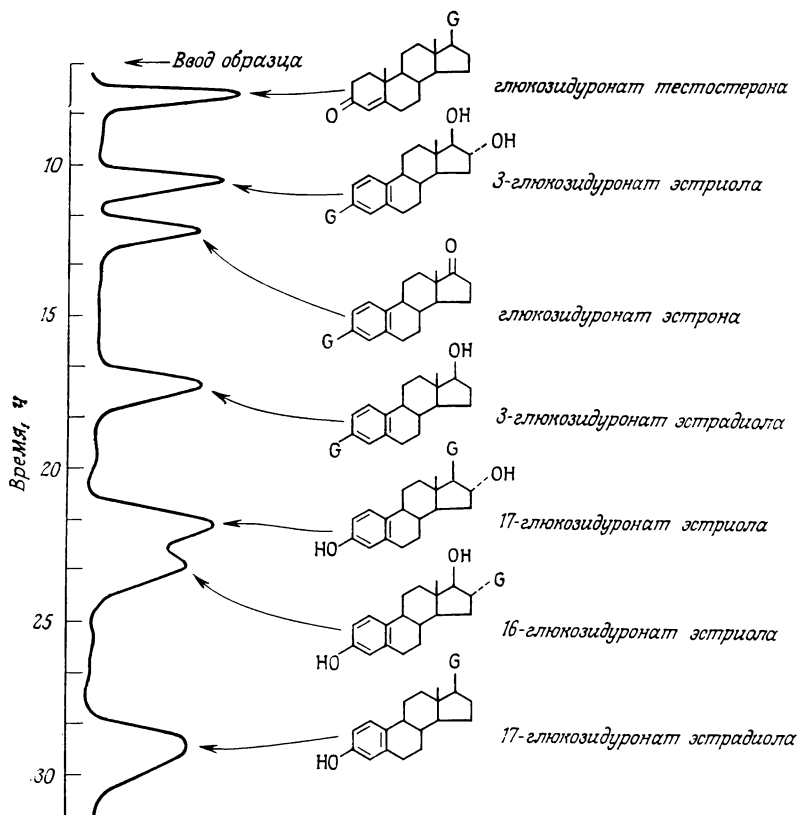


Рис. 6.7. Разделение глюкозидуронатов методом ВЭЖХ [107] (с разрешения авторов).

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: катионит целлекс E, размер частиц 9 мкм; подвижная фаза: 0,5 М Cl⁻+0,05 М ОАс⁻, pH 4,5; температура 40 °С; обнаружение по поглощению при 223 нм.

Разделение конъюгатов эстрогенов с помощью ВЭЖХ на ионитах на основе целлюлозы подробно изучено Ван-дер-Валом и Хубером [107, 108]. На рис. 6.7 показана картина разделения различных глюкозидуронатов на анионите целлекс E (ЕСТЕОЛА-целлюлозе) [107]. Аналогичные результаты получены авторами работы [109]. Обнаружено, что наибольшей селективностью обладают аниониты на основе целлюлозы и полистирола, однако для фракционирования таких конъюгатов пригодна и гидрофобная адсорбционная хроматография на лихросорбе RP-18 или RPZ, покрытом жидким анионитом [110]. Вполне удовлетворительные результаты получены также при

разделении указанных соединений на сильном анионите μ -пар-тисил 10-SAX [111].

Причина неудачных попыток применения обычной ГЖХ для анализа эстрогенов заключается, по-видимому, в неправильном режиме силанизации [112]. Замена насадочных колонок на открытые капиллярные колонки привела, согласно данным работы [113], к резкому увеличению специфичности обнаружения эстрогенов в моче здоровых людей. Наиболее избирательные методы обнаружения этих соединений основаны на использовании масс-фрагментографии [114]. Например, таким образом было проведено определение экстриола в моче [115] и эстрадиола в сыворотке крови [116, 117].

6.6. Производные андростана

Авторы работы [118] изучали разделение 17-кетостероидов, а также их сульфатов и глюкозидуронатов с помощью обращенно-фазовой распределительной хроматографии на сорбенте микропак СН в системах метанол—вода (детектором служил рефрактометр). Установлено, что свободные стероиды элюируются в такой последовательности: дегидроэпиандростерон, эпиандростерон, этиохоланолон, андростерон. Таким образом, экваториальная гидроксильная группа обуславливает большую полярность первых трех стероидов по сравнению с андростероном, в молекуле которого гидроксильная группа занимает аксиальное положение. Среди стероидов, содержащих экваториальную гидроксильную группу, наиболее полярным является дегидроэпиандростерон, в молекуле которого присутствует двойная связь при С-5, затем следует эпиандростерон—соединение с *транс*-сочленением колец А и В—и, наконец, этиохоланолон, представляющий собой А/В-*цис*-изомер эпиандростерона.

Совершенно другая картина наблюдается при разделении при помощи адсорбционной хроматографии на силикагеле (см. рис. 6.8) [119]. В этом случае А/В-*транс*-стероид андростандион элюируется раньше А/В-*цис*-стероида этиохоландиона. Эпиандростерон оказывается более «полярным», чем его ненасыщенный аналог дегидроэпиандростерон, и оба этих соединения, содержащие экваториальную гидроксильную группу, элюируются раньше андростерона—эпимера с аксиальным расположением гидроксильной группы, а 17 β -оксистероид тестостерон вопреки ожиданию является менее «полярным», чем 17 α -эпимер.

В работе [120] описаны методики разделения метаболитов тестостерона с помощью ВЭЖХ и ТСХ. Метод ВЭЖХ был также использован для избирательного обнаружения нанограммовых количеств тестостерона в крови [121], анаболика метандио-

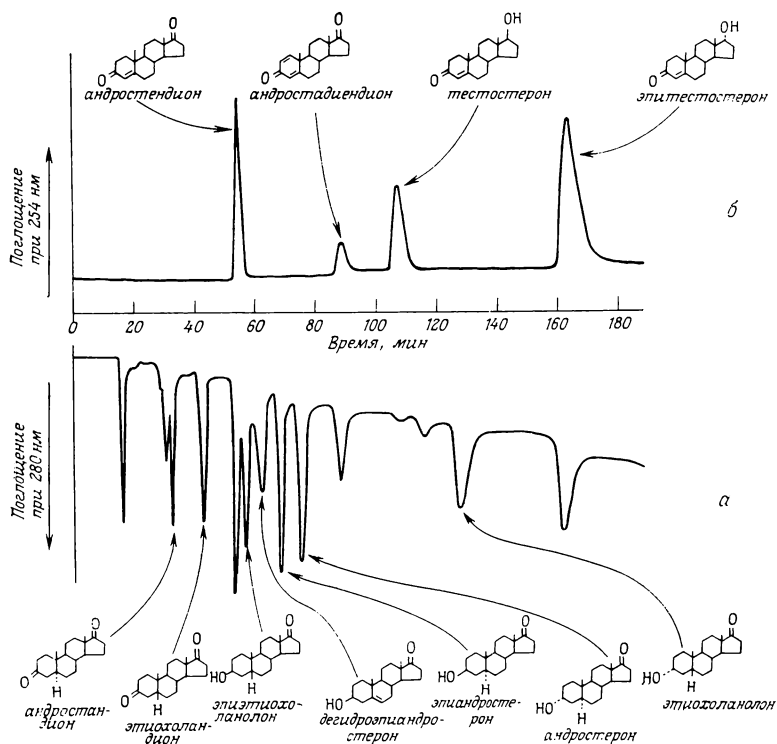


Рис. 6.8. Разделение производных андростана методом ВЭЖХ [119].

Колонка: 600×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: парцисил 5; подвижная фаза: дихлорметан — ацетонитрил — пропанол-2 (179 : 20 : 1); скорость потока; 0,4 мл/мин; давление; 5,52 МПа. Используются два последовательно соединенных УФ-детектора, измеряющих поглощение при 280 (а, шкала 0,1 оптич. ед.) и 254 нм (б, шкала 1,28 оптич. ед.), и двухперьевой самописец. Шкалы самописца: 5мВ (а) и 20 мВ (б); скорость движения ленты: 10 мин/см.

на в моче атлетов и в кормах крупного рогатого скота [122], остаточного тестостерона и тренболон в мясе [123] и противозачаточного средства оксима 17 α -этинил-17 β -ацетокси- Δ^4 -19-норандростен-3-она в фармацевтических препаратах [124].

Некоторые результаты, полученные при разделении производных андростана с помощью адсорбционной хроматографии в тонком слое силикагеля, согласуются с представленными на рис. 6.8. Так, например, если подвижной фазой служит система хлороформ — этилацетат — легкий петролейный эфир (10 : 9 : 1) [125] или же ведется непрерывное элюирование системами гексан — этилацетат или циклогексан — этилацетат [126], этио-

холандион адсорбируется сильнее, чем андростадион. Согласно данным работы [127], авторы которой проводили многократное элюирование смесью дихлорметан — этилацетат (9:1), андростерон является более полярным, чем эпиандростерон. Однако в двух упомянутых выше системах [125, 126] эти соединения по своей хроматографической подвижности располагаются в обратном порядке.

ТСХ лежит в основе флуориметрического метода обнаружения 2 β -окси-3 α -амино-5 α -андростан-17-она — стероидного препарата, подавляющего аритмию [128], и стероидных анаболиков (например, тенболона) в мясе [129—131]. ТСХ используют также для предварительной очистки препаратов в радиоиммунологических методах определения конъюгатов тестостерона в моче и сыворотке крови [132] и Δ^{16} -5 α -андростен-3 α -ола в плазме крови [133].

Пары эпимерных C₁₉-стероидов, обладающих одинаковой хроматографической подвижностью в условиях ТСХ, во многих случаях можно разделить с помощью ГЖХ [126], причем для этого пригодны как незащищенные соединения, так и их триметилсилиловые эфиры. В работе [134] описано силилирование андростерона меченными тритием реагентами. Для газожидкостного хроматографического анализа пригодны также производные, образующиеся в результате ферментативного окисления 3 β -оксиандростенов [135]. Чтобы для обнаружения дегидроэпиандростерона в плазме крови использовать детектор по захвату электронов, этот стероид можно превратить в О-пентафторбензилоксим триметилсилилового эфира [136], моноиодтриметилсилиловый эфир [137] или гептафторбутират [138]. С помощью пламенно-ионизационного детектора со щелочными металлами обнаруживали этиохоланолон в плазме крови после его этерификации диметилтиофосфиновой кислотой [139]. Содержание метаболитов [4-¹⁴C]-андростен-3,17-диона в тканях оценивали с помощью проточного счетчика радиоактивности [140].

Использование открытых капиллярных колонок с непористым слоем в сочетании с масс-спектрометром позволило существенно расширить возможности газохроматографического анализа андрогенов [141]. С помощью такого метода был осуществлен анализ различных C₁₉O₃-стероидов [142] и синтетических анаболиков [143]. Высокоселективный метод обнаружения по выбранному в масс-спектре иону был использован при определении андрогенов в тканях предстательной [144] и молочных [145] желез человека, а также в тканях свиней [146]. Наконец, масс-спектрометрия составляет основу чрезвычайно чувствительного метода избирательного определения тестостерона в крови [147, 148].

6.7. Производные прегнана

Этот раздел посвящен всем производным прегнана, за исключением адренокортикотропных гормонов, которые рассмотрены в разд. 6.8. Восстановление прогестерона приводит к образованию множества изомерных C_{21} -стероидов, различающихся конфигурацией при С-3, С-5 и С-20. Проблемы, связанные с разделением этих соединений, являются своего рода тест-системой на изобретательность химика-аналитика. Эгерту [149] удалось решить эту трудную задачу: он осуществил разделение на тонкослойных пластинках путем двукратного элюирования.

Лин и др. [150] показали, что большинство изомерных продуктов восстановления прогестерона можно разделить, используя сочетание адсорбционной и обращенно-фазовой распределительной ВЭЖХ. Рис. 6.9 [150] иллюстрирует эффективность разделения на 60-сантиметровой колонке с силикагелем (раз-

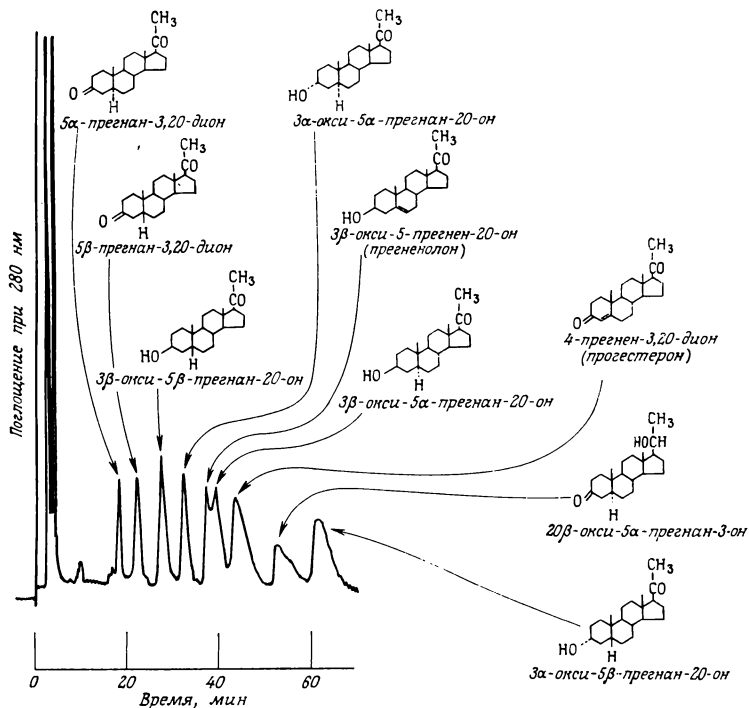


Рис. 6.9. Разделение смеси производных прегнана, содержащей три диона и шесть монооксимонокетонов, методом адсорбционной ВЭЖХ [150].

Колонка: 600×2 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил 5; подвижная фаза: 0,25%-ный раствор этанола в дихлорметане; скорость потока: 1 мл/мин; давление: 22,1 МПа; шкала детектора: 0,05 оптич. ед.; шкала самописца: 10 мВ; скорость ленты: 6 см/ч.

мер частиц 5 мкм). Из трех присутствующих в анализируемой смеси дионов наименее и наиболее полярными являются соответственно 5α -прегнал-3,20-дион и 4-прегнен-3,20-дион (прогестерон), а полярность 3-окси-20-кетопроизводных возрастает в ряду: $3\beta,5\beta < 3\alpha,5\alpha < 3\beta,\Delta^5 < 3\beta,5\alpha < 3\alpha,5\beta$. Адсорбционная хро-

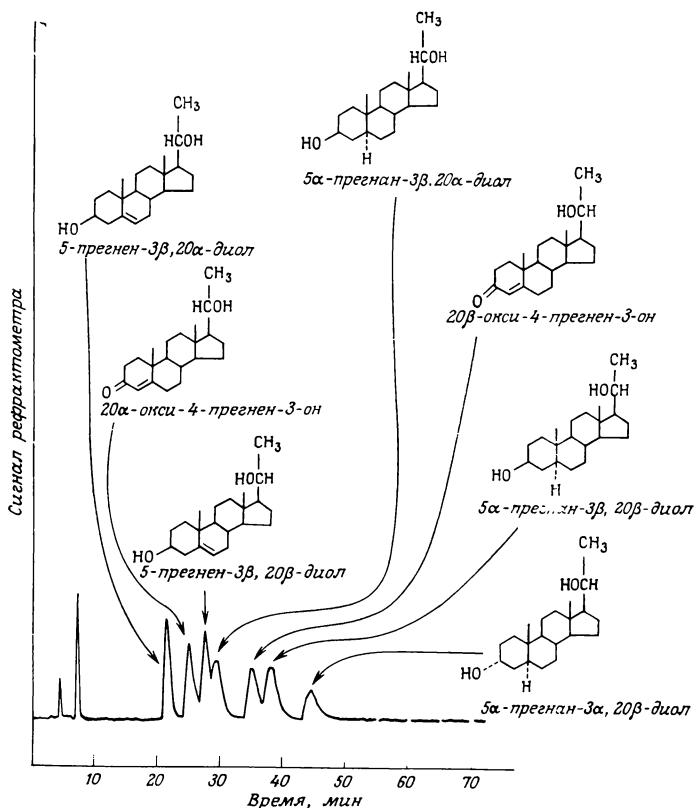


Рис. 6.10. Разделение смеси производных прегнана, содержащей два монооксимокетона и пять диолов, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [150].

Колонка: 500×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс BP-ODS; подвижная фаза: 60%-ный водный ацетонитрил; скорость потока: 1 мл/мин; давление: 9,6 МПа; чувствительность рефрактометра: $8 \times$; шкала самописца: 10 мВ; скорость ленты: 12 см/ч.

матография обладает значительно более высокой разрешающей способностью по отношению к эпимерным дикетонам, чем обращенно-фазовая распределительная хроматография; однако при разделении эпимеров 20-оксисоединений наблюдается обратное (рис. 6.10) [150].

С 50-сантиметровой колонки, содержащей сорбент с привитыми октадецилсилильными остатками, 60%-ный водный ацето-

нитрил сначала элюирует производные 20 α -прегнана, а затем их 20 β -эпимеры. Следует отметить, что для обнаружения насыщенных спиртов необходимо использовать рефрактометр. 3-Оксиэпимеры, относящиеся к группе А/В-*транс*-соединений, лучше разделяются в условиях обращенно-фазовой распределительной хроматографии, тогда как для разделения соответствующих А/В-*цис*-производных более пригодна адсорбционная хроматография. В тех случаях, когда необходимо отделить Δ^5 -стероиды от их 5 α -аналогов, обращенные фазы предпочтительнее [150]. К аналогичным выводам об относительных достоинствах адсорбционной и обращенно-фазовой распределительной ВЭЖХ как методов анализа производных прегнана пришли также авторы работы [151].

В работах Ванденхьювела [152, 153] получил дальнейшее развитие предложенный автором метод математической обработки данных ГЖХ, позволяющий установить связь между структурой производных прегнана и их хроматографическими свойствами. Для обнаружения прогестерона с помощью детектора по захвату электронов наилучшим образом подходит его дипентафторбензоилоксим [154]; если же анализируются аналоги 17-ацетоксипрогестерона, например ацетат меленгэстрола, необходимость предварительной модификации анализируемых соединений отпадает [155]. Масс-фрагментографию едва ли можно отнести к числу рутинных методов определения прогестерона в сыворотке крови, однако благодаря своей высокой специфичности и чувствительности она служит в качестве системы контроля достоверности данных, получаемых с помощью других методов анализа [156]. При изучении метаболизма производных прегнана были использованы избирательно дейтерированные аналоги и снабженный компьютером хроматомасс-спектрометр [157].

6.8. Кортикостероиды

Хроматографии адrenокортикостероидов посвящен относительно недавно опубликованный обзор [158]. Информация о незначительных усовершенствованиях методик анализа этих соединений продолжает появляться в литературе. Например, описаны методики разделения метиловых эфиров различных прегнанглюкозидуронатов с помощью ионообменной хроматографии на фильтровальной бумаге, пропитанной жидкими ионами [159], ТСХ на полиамидных пластинках [160] и флуориметрического сканирования тонкослойных хроматограмм [161, 162].

Появление гель-хроматографии привело к существенному усовершенствованию методов очистки экстрактов, содержащих

кортикостероиды [163—165]. Для выделения альдостерона [166—168] и других кортикоидных гормонов часто используют сефадекс LH-20 [169, 170].

К числу адренокортикотропных гормонов, для которых предложены новые методики анализа с помощью ГЖХ, отно-

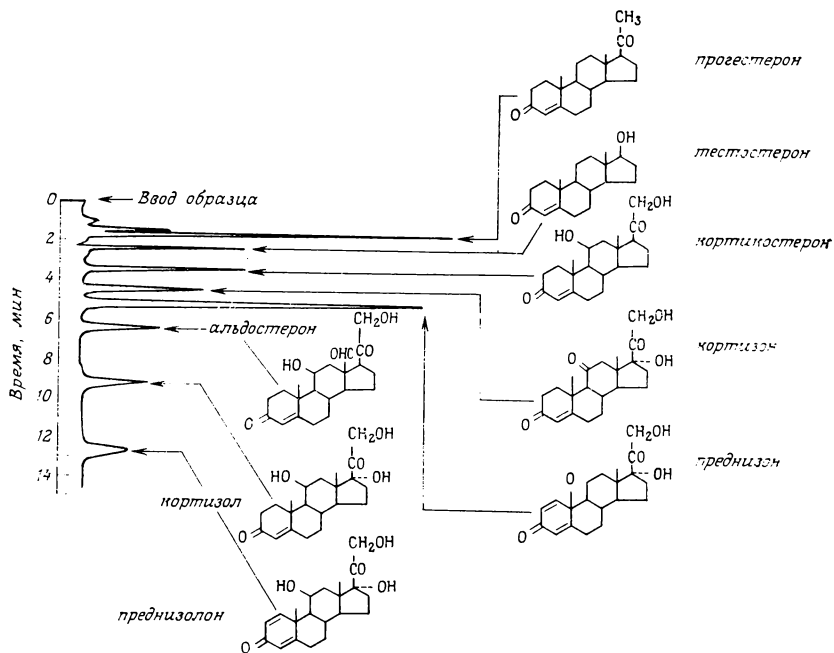


Рис. 6.11. Разделение стероидных гормонов методом ВЭЖХ [231] (с разрешения авторов).

Колонка: 300×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: сферосил ХОА, размер частиц 4—8 мкм; подвижная фаза: дихлорметан — этанол — вода (936 : 47 : 17); скорость потока: 1,14 мл/мин; обнаружение по поглощению при 240 нм.

сятся: 18-оксикортикостерон [171, 172], 18-окси-11-дезоксикортикостерон [173, 174], альдостерон [175], альдадион [176], преднизолон и преднизон [177]. Для анализа кортикостероидов были использованы методы масс-фрагментографии [178] и капиллярной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [179] (ср. разд. 6.9).

Наиболее интенсивно совершенствуются методы ВЭЖХ кортикостероидов. Это обусловлено тем, что указанные соединения легко обнаруживаются с помощью детекторов с фиксированной длиной волны при 254 нм и не требуют никакой модификации. В рамках настоящего обзора можно процитировать лишь несколько примеров из пятидесяти публикаций, посвященных специ-

ально кортикостероидам. Работа [180] может служить примером использования хроматографии на кремниевой кислоте. Авторы этой работы на колонке с лихросорбом Si100 (длина колонки 25 см, внутренний диаметр 4,5 мм, размер частиц 5 мкм) в системе метанол — хлороформ (20-минутный линейный градиент концентрации метанола от 0,5 до 5% и последующее элюирование в изократическом режиме) разделили смесь, содержащую следующие природные адренокортикоидные гормоны (указаны в порядке их элюирования): дезоксикортикостерон, дегидрокортикостерон, дезоксикортизол, кортикостерон, кортизон, альдостерон, кортизол. В описанных ранее методиках проводилось изократическое элюирование смесями хлороформа (или дихлорметана) с метанолом (или с этанолом) [181—184] (ср. также рис. 6.11). Для определения нанограммовых количеств кортикостероидов можно использовать методику флуориметрического анализа, основанную на превращении этих соединений в дансилгидразоны [185].

Метод Скотта и Диксона [186] является недавно опубликованным примером использования обращенно-фазовой распределительной ВЭЖХ. Авторы установили, что с колонки размером $120 \times 4,5$ мм (внутр. диаметр), содержащей гиперсил ODS, природные и синтетические кортикостероиды элюируются 45%-ным водным метанолом в порядке уменьшения их полярности. Наиболее эффективным сорбентом, применяемым для разделения кортикостероидов, является силикагель с привитыми октадецильными остатками [187—192], однако для этой цели были использованы также и другие неполярные сорбенты на основе силикагеля, содержащие, например, октильные [193], цианопропильные [194], нитро- [195] или фенильные [196] группы. С помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ были разделены кортесовые кислоты в виде их *n*-бромфенациловых эфиров [197].

В настоящее время метод ВЭЖХ широко используют для анализа таких аналогов кортикоидов, как преднизолон [198, 199], метилпреднизолон [200, 201], триамцинолонацетонид [202, 203], будезонид [204], дексаметазон [205], бетаметазон [206] и канренон [207]. Некоторые методики анализа лекарственных препаратов автоматизированы [208].

6.9. Различные гормоны

В этом разделе описаны достижения в области хроматографии биологических экстрактов, лекарственных препаратов и других смесей, содержащих стероидные гормоны разных классов. Газо-жидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии стероидных гормонов посвящены обзоры [209, 210]. В работе [211] проведено сравнений бумажной, тонкослойной

и газовой хроматографии как методов определения нейтральных стероидов в моче. В качестве достоинств плоскостной хроматографии отмечены: высокая скорость и низкая стоимость анализа, специфичность методов обнаружения веществ и возможность применения таких типов хроматографии для предварительной очистки препаратов и разделения соединений на классы. Главное достоинство хроматомасс-спектрометрии состоит в том, что она позволяет получить количественную информацию о метаболитах мочи.

Силикагель с химически связанными алкилсилильными остатками был использован для обращенно-фазовой ТСХ стероидных гормонов [212]. На примере этих соединений продемонстрирована эффективность методики программируемого многократного элюирования [213]. В работах [214, 215] подробно изучено влияние состава элюента на разрешающую способность ТСХ разнообразных стероидов. Выводы, к которым пришли авторы, в равной степени справедливы и для ВЭЖХ. Предложены некоторые новые реагенты для обнаружения стероидных гормонов на тонкослойных пластинках: фосфомолибденванадиевые кислоты [216], хлорамин Т с серной кислотой [217], хлорид олова с монохлоруксусной кислотой [218] и формиат мышьяка [219]. Описано также проявление хроматограмм путем их инкубирования с реагентами, содержащими 3β -оксистероидоксидазу [220].

Смолу амберлит ХАD-2, не содержащую ионогенных групп, широко используют для выделения стероидных гормонов и их конъюгатов [221]. Липофильная гель-хроматография позволяет провести эффективное фракционирование конъюгатов нейтральных стероидов перед их анализом с помощью хроматомасс-спектрометрии [9, 222, 223]. Связь между структурой стероидов и их поведением в условиях гель-хроматографии изучена Воузом и др. [224]. Описано применение сефадекса LH-20 [225, 226] и липидекса 5000 [227, 228] для анализа стероидных гормонов.

Хара и Хаяши [229] изучили влияние различных факторов на характеристики удерживания стероидных гормонов в условиях адсорбционной и обращенно-фазовой ВЭЖХ, а сравнительно недавно Хара и др. [230] предложили двухкомпонентные системы растворителей для ВЭЖХ на силикагеле. В более ранней работе Хесса и Хёвермана [231] описана ВЭЖХ стероидных гормонов на силикагеле в трехкомпонентных двухфазных системах (рис. 6.11). Полученные результаты легли в основу предпринятого Ван-дер-Бергом и др. [232] исследования роли механизма сорбции в обеспечении оптимального разделения этих соединений. В работах [233, 234] изучено разделение многочисленных стероидных гормонов с помощью обращенно-фазо-

вой ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования и определена селективность различных обращенных фаз.

Гормоны из тканей яичников были очищены с помощью ВЭЖХ [235]. Сравнение различных систем ВЭЖХ, использованных для очистки стероидов надпочечников и половых желез, показало, что наилучшие результаты дает хроматография на колонках с сорбентом DIOL, содержащим гидроксильные группы, в градиенте из системы *n*-гексан — диоксан [236]. Другая методика очистки этих стероидов включает две стадии: колоночную хроматографию на целите и обращенно-фазовую ВЭЖХ [237].

Нанограммовые количества стероидных гормонов можно легко обнаружить по их поглощению в УФ-области или с помощью последовательно соединенных УФ-детектора и рефрактометра [238]. Превращение кетостероидов в флуоресцентные производные — изоникотинилгидразоны — позволяет уменьшить предел обнаружения этих соединений до уровня нескольких пикомолей [239].

Для газохроматографического и хроматомасс-спектрометрического анализа стероидные гормоны превращают в различные термически устойчивые и летучие производные [240], такие, как метилоксимы [241, 242], О-ω-галогеналкилоксимы [243] и эфиры диметилтиофосфиновой кислоты [244]. Наиболее популярными производными по-прежнему остаются различные силиловые эфиры [245], в том числе и некоторые эфиры с объемистыми заместителями — триалкилсилиловые [246], аллилдиметилсилиловые [247] и *трет*-бутилдиметилсилиловые [248—251].

Значительный вклад в развитие метода ГЖХ стероидных гормонов внесли работы, в которых установлена связь между структурой анализируемых соединений и величиной сигнала пламенно-ионизационного детектора [252] и найдена зависимость относительного времени удерживания, выраженного в метиленовых единицах, от температуры колонки [253]. Следует отметить также работы, посвященные использованию смешанных неподвижных фаз [254] и разделению эпимеров стероидов на нематических жидких кристаллах [255, 256].

Введение в практику исследований открытых капиллярных колонок с пористым слоем позволило существенно увеличить разрешающую способность метода ГЖХ [257]. В некоторых случаях можно хроматографировать немодифицированные стероиды [258], однако обычно используют их производные, которые вводят в капиллярные колонки при помощи специальных инжекторов [259, 260]. Влияние температуры колонки на эффективность разделения изучено в работе [261]. Приведенная в работе [262] хроматограмма сложной смеси стероидов, обычно называемая стероидным профилем, в настоящее время ши-

роко используется эндокринологами в качестве эталона при анализе препаратов крови [263, 264] и мочи [265—271]. Второе наиболее значительное достижение в области развития ГЖХ стероидных гормонов связано с появлением метода масс-фрагментографии, который, однако, пока еще не получил широкого распространения. Примерами, иллюстрирующими применение этого метода, могут служить работы, в которых исследовали циркулирующие в крови гормоны [272, 273] и гормоны, секретируемые яичниками [274, 275]. При изучении гормонов были использованы также методики газовой хроматографии радиоактивно меченных соединений [276] и пиролитической ГЖХ [277].

6.10. Желчные кислоты

Методы анализа желчных кислот описаны в обзоре Сьёвала [278], опубликованном в 1977 г. Тонкослойной хроматографии желчных кислот и спиртов посвящен появившийся в 1976 г. обзор Энерота [279]. Икава и Гото [280] опубликовали методику двумерной ТСХ. Предложены усовершенствованные по своему составу системы растворителей для хроматографии свободных желчных кислот [281], их метиловых эфиров [281, 282] и кетопроизводных [283, 284]. Известны также системы, в которых можно отделить свободные желчные кислоты от их конъюгатов с глицином, а последние — от тауроконъюгатов [285—287]. Кроме того, методы ТСХ и обращенно-фазовой ТСХ позволяют различить большинство конъюгированных желчных кислот [288—291] и сульфопроизводных солей желчных кислот [292, 293]. Для дополнительного подтверждения вывода об идентичности тех или иных соединений служат специфические окрашивающие реагенты [294, 295]. Количество вещества можно оценить по интенсивности флуоресценции производных, образующихся в результате обработки хроматограмм серной кислотой [296, 297], либо по поглощению этих производных [298]. В последнем случае соответствующие зоны предварительно экстрагируют. Методика количественного определения радиоактивно меченных соединений также включает стадию экстракции [299]. Для анализа желчных кислот пригодна и плоскостная хроматография на хроматодах [300].

В случае ВЭЖХ для обнаружения достаточно больших количеств желчных кислот можно использовать рефрактометр, а при работе в аналитическом режиме — более чувствительный и специфичный УФ-детектор, измеряющий поглощение при 210 нм [301]. Желчные кислоты обычно хроматографируют на обращенных фазах, которые, как правило, обладают достаточно высокой разрешающей способностью [301—304], однако

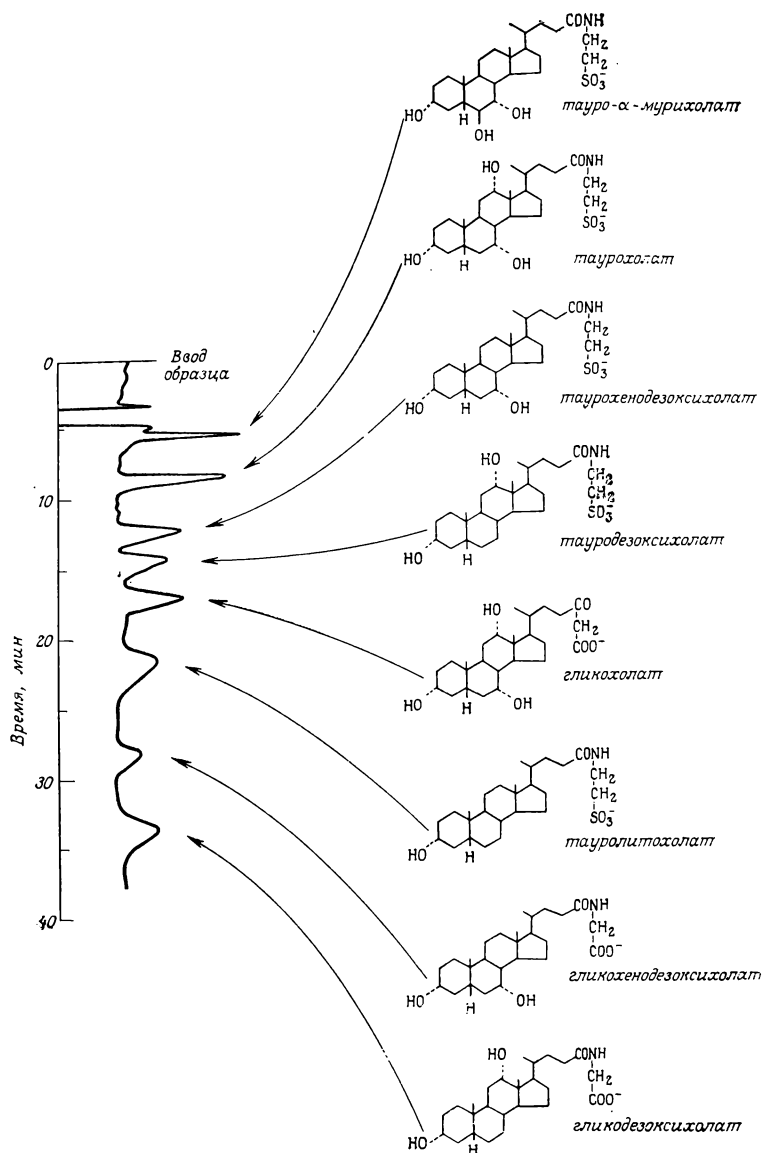


Рис. 6.12. Разделение конъюгированных желчных кислот методом ВЭЖХ [305] (с разрешения авторов).

Колонка: 300×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: сорбент для анализа жирных кислот (Waters Assoc.); подвижная фаза: 8,8 мМ фосфатный буфер (pH 2,5) — пропанол-2 (17 : 8); скорость потока: 1 мл/мин; чувствительность рефрактометра: 8%.

для разделения некоторых пар изомеров, например 5-эпимеров, необходимо использовать адсорбционную хроматографию на силикагеле [305]. Типичная картина разделения конъюгированных желчных кислот в условиях обращенно-фазовой распределительной хроматографии представлена на рис. 6.12 [305]. Видно, что таурохолаты являются более полярными соединениями, чем конъюгаты, содержащие остаток глицина. С помощью обращенно-фазовой распределительной хроматографии можно также разделить сульфопроизводные желчных кислот [306]. В работе [307] описана методика определения свободных и конъюгированных желчных кислот, основанная на использовании обращенно-фазовой ВЭЖХ в присутствии ион-парных реагентов.

Перед стадией ВЭЖХ можно провести предварительное фракционирование биологических образцов, с тем чтобы отделить свободные желчные кислоты от их конъюгатов, содержащих остатки глицина или таурина. Для этого служат методы ТСХ [308] и ионообменной хроматографии либо на сефадексе LH-20 с привитыми диэтиламинопропильными [309] или пиперидиноксипропильными [310] остатками, либо на TSK-геле IEX 540 DEAE [311]. Сульфопроизводные желчных кислот обнаруживают по их поглощению при 210 нм [312]. Превращение желчных кислот в их *n*-нитробензиловые [313, 314] или фенацilloвые [315] эфиры позволяет обнаруживать эти соединения по поглощению при 254 нм.

Газовой хроматографии желчных кислот посвящен обзор Куксиса [316]. Использование ГЖХ для разделения этих соединений с необходимостью предполагает их превращение в производные. В случае хроматомасс-спектрометрии [317, 318] и капиллярной ГЖХ [319] наиболее подходящими производными являются силиловые эфиры. При получении частично замещенных триметилсилиловых эфиров в качестве силилирующего агента используют N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид [320]. Для хроматомасс-спектрометрического анализа наиболее пригодны ацетаты метиловых эфиров [321] и трифторацетаты этиловых эфиров [322] желчных кислот, а в качестве неподвижных фаз — поли-S-179 [323] и цианопропилфенилсилоксан [324]. Для разделения как ацетатов, так и триметилсилильных производных рекомендуют использовать полиметафеноксилан [325]. Описана методика хроматомасс-спектрометрического анализа желчных кислот в виде трифторацетилпроизводных гексафторизопропиловых эфиров [326] и упрощенная методика определения гептафторбутиратов желчных кислот и их конъюгатов с помощью детектора по захвату электронов [327].

Среди многочисленных вариантов применения ГЖХ для разделения желчных кислот следует упомянуть метод, представ-

ляющий собой сочетание ГЖХ и ТСХ, который позволяет разделить насыщенные и ненасыщенные холяновые кислоты [328] и определить содержание сульфированных и несulfированных желчных кислот в сыворотке крови [329], а также новые методы ГЖХ-анализа вторичных желчных кислот [330] и желчных спиртов [331].

6.11. Экдистероиды

Экдистероиды существенно отличаются от других стеринов как по своим хроматографическим свойствам, так и по спектральным характеристикам. Наличие большого числа функцио-

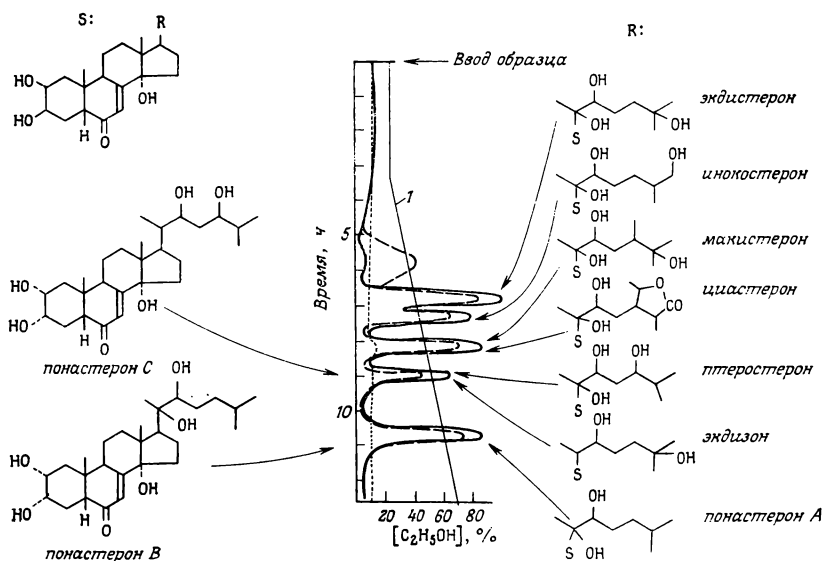


Рис. 6.13. Хроматограмма смеси экдистероидов [338] (с разрешения авторов).

Колонка: 1500×9 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: амберлит XAD-2, размер частиц 200—400 меш; подвижная фаза: водный этанол (линейный градиент концентрации этанола от 20 до 70%); скорость потока: 1 мл/мин; температура: 20 °С; обнаружение по поглощению при 230 нм (— — — — —), 250 нм (——) и 300 нм (.....). 1 — профиль градиента.

нальных групп обуславливает высокую полярность этих соединений, а благодаря присутствию карбонильной группы, сопряженной с двойной связью, они имеют полосу поглощения вблизи 254 нм. На тонкослойных пластинках их можно легко обнаружить с помощью коротковолнового УФ-облучения [332]. Количество экдистероидов, элюированных с препаративных тонкослойных пластинок, оценивают по амплитуде их полосы погло-

щения [333], а при аналитической ТСХ на пластинках с флуоресцентным индикатором мерой количества вещества служит эффективность тушения флуоресценции [334]. Метод селективного обнаружения экистероидов основан на их превращении в интенсивно флуоресцирующие эфиры фенантренборной кислоты [335].

Методы ВЭЖХ экистероидов рассмотрены в обзоре Хашимото [336], а в работе Вильсона и др. [337] проведен сравнительный анализ методов высокоэффективной жидкостной и газо-жидкостной хроматографии. Благодаря сравнительной простоте обнаружения экистероидов по их поглощению в УФ-области эти соединения оказались первыми представителями класса стероидов, для разделения которых был использован метод, представляющий собой прообраз ВЭЖХ [338]. На рис. 6.13, который воспроизведен из этой классической работы Хори, посвященной изучению гормонов линьки насекомых, показано разделение смеси экистероидов на колонке с порошкообразным макросетчатым сополимером стирола и дивинилбензола в линейном градиенте концентрации этанола в воде. Видно, что гормоны элюируются в порядке уменьшения их полярности. Хроматографический анализ на современных колонках занимает, естественно, не столь много времени, однако он далеко не всегда обеспечивает лучшее разделение. В качестве сорбентов для распределительной хроматографии были использованы корасил II [339] и зорбакс SIL [340], для обращенно-фазовой распределительной хроматографии — бондапак фенил [339], бондапак C₁₈ [341], зорбакс ODS [340] и зорбакс C-8 [340], а для гидрофобной адсорбционной хроматографии — пермафаза ЕТН [342].

Триметилсилиловые эфиры экистероидов в отличие от аналогичных эфиров большинства других стероидов можно обнаруживать на уровне нескольких пикограммов с помощью детектора по захвату электронов, однако при их получении необходимо соблюдать определенные меры предосторожности [343]. Эти производные пригодны для количественного анализа с помощью метода масс-фрагментографии [344].

6.12. Лактоны

В этом разделе рассмотрены полярные стероиды, содержащие лактонный цикл, а именно: витанолиды, карденолиды и буфадиенолины.

Витанолиды наряду с α,β -ненасыщенной δ -лактонной группировкой содержат карбонильную группу, сопряженную с двойной связью, и поэтому их можно легко обнаружить по поглощению в УФ-области. Вслед за сообщением о разделении мета-

болитов витаферина А с помощью ВЭЖХ в режиме детектирования по изменению коэффициента преломления элюата [345] появилась работа Гюнтера и др. [346], в которой изучено разделение двенадцати витанолидов, и для обнаружения этих соединений использован УФ-детектор. На рис. 6.14 в качестве примера приведена картина разделения на 366-сантиметровой спи-

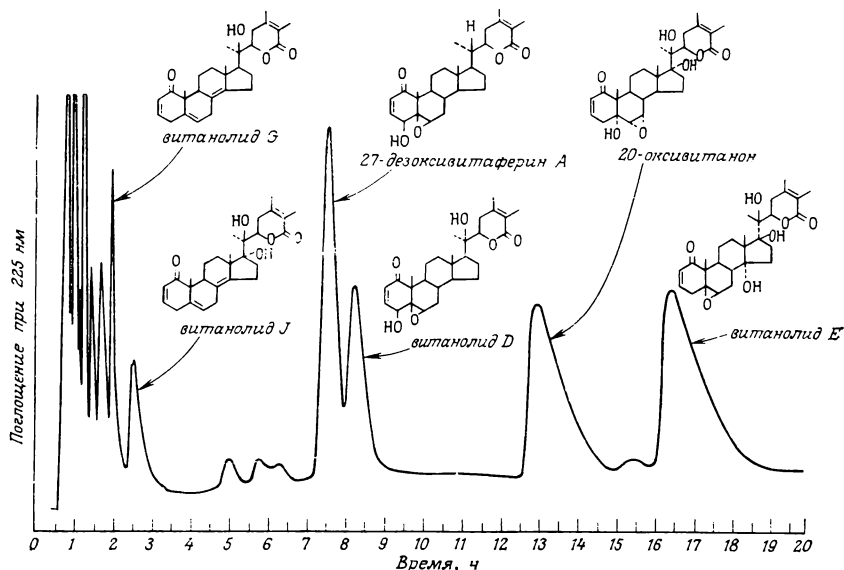


Рис. 6.14. Разделение витанолидов методом ВЭЖХ [346].

Колонка: 3660×3,7 мм; неподвижная фаза: порасил А, размер частиц 37—75 мкм; подвижная фаза: н-гексан — пропанол-2 (9 : 1); скорость потока: 0,2 мл/мин; давление: 7,6 МПа; шкала детектора: 0,2 оптич. ед.; шкала самописца: 10 мВ; скорость ленты: 2 см/ч.

ральной колонке, содержащей порасил А. Полярность витанолидов зависит не только от числа и положения гидроксильных групп в молекуле, но и от их природы и возрастает в ряду: третичные спирты < вторичные спирты < первичные спирты.

По существу лишь два хроматографических метода — ТСХ и ВЭЖХ — обеспечивают удовлетворительное разделение сердечных гликозидов. Предварительная обработка пластинок с силикагелем борной кислотой приводит к избирательному уменьшению хроматографической подвижности гликозидов, содержащих 1,2-цис-диольную группировку, и к увеличению подвижности 1,3-диолов [347]. Более высокого разрешения удалось добиться путем повторного [348] или непрерывного [349] элюирования хроматограмм. Высокоэффективная ТСХ была использована для разделения гликозидов из *Digitalis* [350]. Про-

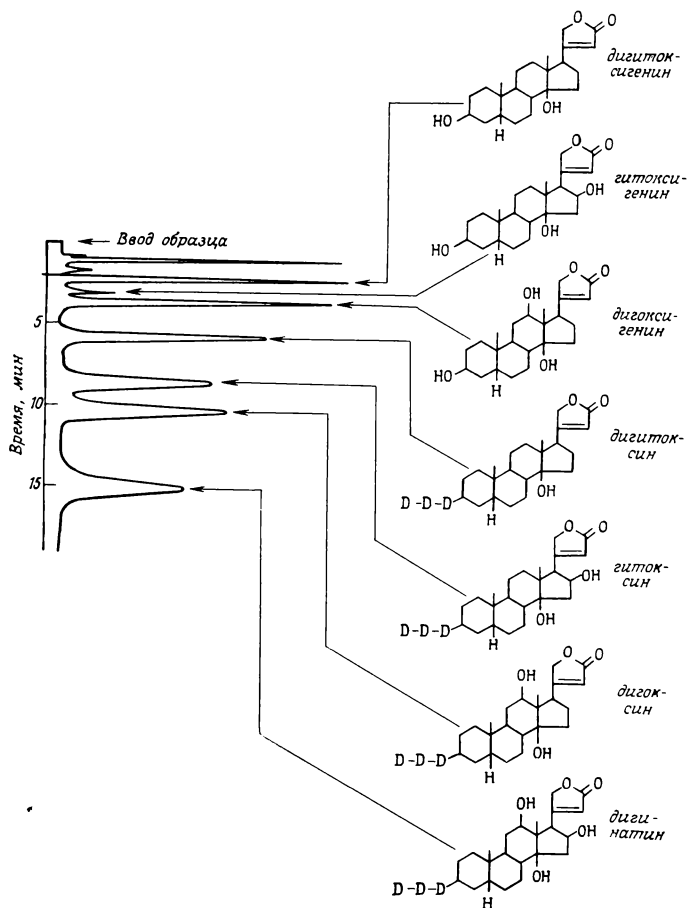


Рис. 6.15. Разделение сердечных генинов и гликозидов методом ВЭЖХ [354] (с разрешения авторов).

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: лихсорб Si60, размер частиц 10 мкм; подвижная фаза: н-пентанол — ацетонитрил — изооктан — вода (35 : 12 : 124 : 2); скорость потока: 1,3 мл/мин; обнаружение по поглощению при 220 нм; скорость ленты самописца: 1 см/мин.

граммируемое многократное элюирование таких пластинок обеспечивает наилучшее разделение гликозидов [351], а с помощью флуороденситометрии полученных хроматограмм можно, например, оценивать количество дигитоксина в сыворотке [352]. Другой метод количественного определения дигитоксина и его метаболитов в крови и в моче, описанный в работе [353], основан на том, что в присутствии этих соединений уменьшает-

ся скорость переноса ионов $^{86}\text{Rb}^+$ через мембрану эритроцитов. Для разделения анализируемой смеси были использованы пластинки с силикагелем, пропитанным 15%-ным раствором формамида в ацетоне, которые дважды элюировали в системе метилэтилкетон — ксилол (1 : 1).

На рис. 6.15 показано разделение генинов и гликозидов с помощью распределительной ВЭЖХ на колонке с силикагелем. Видно, что генины элюируются раньше гликозидов и в пределах каждой из этих двух групп полярность соединений зависит от числа и положения гидроксильных групп в их молекулах. Аналогичные результаты получены в работе [355]. Сравнение обычной и обращенно-фазовой распределительной хроматографии показало, что последняя обладает некоторыми преимуществами [356]. В работе [357] описано разделение стероидных гликозидов на колонке с μ -бондапаком C_{18} в градиенте концентрации ацетонитрила от 25 до 40% в воде. Установлено, что гликозиды дигоксигенина, как и следовало ожидать, элюируются раньше гликозидов дигитоксигенина, однако в пределах каждой группы наблюдается следующий порядок элюирования: сначала из колонки выходит соответствующий генин, затем его моно-, ди- и, наконец, тригликозид. ВЭЖХ на колонке с μ -бондапаком C_{18} в водном метаноле или тетрагидрофуране использована также для разделения полуэфиров буфадиенолидов [358]. Аналогичный метод разделения буфадиенолидов, основанный на использовании обращенно-фазовой распределительной хроматографии на лихросорбе 5RP-8 в режиме детектирования соединений в элюате по поглощению при 280 нм, описан в работе [359]. Карденолиды обнаруживают по поглощению при 220 нм. Чтобы обеспечить возможность обнаружения этих соединений на уровне нескольких нанограммов и использовать для этого УФ-детектор, измеряющий поглощение при 254 нм, их превращают в 4-нитробензоаты [360]. Обработка элюата соляной кислотой, приводящая к образованию флуоресцентных производных, позволяет уменьшить предел обнаружения карденолидов до 0,5 нг [361].

Литература

1. *Heftmann E.* Chromatography of Steroids. J. Chromatogr. Library Series. Vol. 8. Amsterdam: Elsevier, 1976.
2. *Heftmann E.* — In: Chromatography./Ed. Heftmann E. 3rd Edn. New York: Van Nostrand Reinhold, 1974, p. 610.
3. *Lisboa B. P.* — In: Fundamentals of Lipid Chemistry./Eds. Burton R. M., Guerra F. C. MO, Webster Groves: Bi-Science Publications Div., 1974, p. 439.
4. *Görög S., Szász Gy.* Analysis of Steroid Hormone Drugs. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1978.
5. *Heftmann E. J.* Liquid Chromatogr., 2, 1137 (1979).

6. Lisboa B. P. — In: Lipid Chromatographic Analysis. Vol. 2./Ed. Marinetti G. V. 2nd Edn. New York: Dekker, 1976, p. 399.
7. Touchstone J. C., Dobbins M. F. — In: Densitometry in Thin Layer Chromatography./Eds. Touchstone J. C., Sherma J. New York: Wiley, 1979, p. 633.
8. Procházka Z. — In: Liquid Column Chromatography. J. Chromatogr. Library Series. Vol. 3/Eds. Deyl Z., Macek K., Janák J. Amsterdam: Elsevier, 1975, p. 593.
9. Sjövall J., Axelsson M. J. Steroid Biochem., **11**, 129 (1979).
10. Sjövall J. J. Steroid Biochem., **6**, 227 (1975).
11. Nyström E., Sjövall J. Methods Enzymol., **35B**, 378 (1975).
12. Vestergaard P. Acta Endocrinol. (Copenhagen), **88**, Suppl. 217, (1978).
13. Kautsky M. P. (Editor). Recent Applications of HPLC to Steroid Analysis. Chromatogr. Sci. Series, Vol. 16. New York: Dekker, 1980.
14. Heftmann E., Hunter I. R. J. Chromatogr., **165**, 283 (1979).
15. Kingston D. G. I. J. Nat. Prod., **42**, 237 (1979).
16. Nerio H., Kosior A. Herba Pol., **21**, 324 (1975).
17. Teng J. I., Smith L. L. — In: Densitometry in Thin-Layer Chromatography./Eds. Touchstone J. C., Sherma J. New York: Wiley, 1979, p. 661.
18. Fumagalli R. — In: Lipid Chromatographic Analysis./Ed. Marinetti G. V. 2nd Edn., Vol. 3. New York: Dekker, 1976, p. 791.
19. Homberg E. Fette, Seifen, Anstrichm., **79**, 234 (1977).
20. Aizetmüller K. J. Chromatogr., **113**, 231 (1975).
21. Privett O. S., Erdahl W. L. Chem. Phys. Lipids, **21**, 361 (1978).
22. Knights B. A. Anal. Biochem., **80**, 324 (1977).
23. Sliwowski J. K., Caspi E. J. Steroid Biochem., **8**, 47 (1977).
24. Nelson W. R., Natelson S. Clin. Chem., **23**, 835 (1977).
25. Wintersteiger R., Gubitz G. Sci. Pharm., **46**, 269 (1978).
26. Seher A., Vogel H. Fette, Seifen, Anstrichm., **78**, 106 (1976).
27. Homberg E., J. Chromatogr., **139**, 77 (1977).
28. Homberg E., Bielefeld B. J. Chromatogr., **180**, 83 (1979).
29. Takagi T., Sakai A. et al. J. Chromatogr., Sci., **17**, 212 (1979).
30. Schwartz R. D., Mathews R. G., Ramachandran S., Henly R. S., Doyle J. E. J. Chromatogr., **112**, 111 (1975).
31. Brooks C. J. W., Smith A. G. J. Chromatogr., **112**, 499 (1975).
32. Edmonds C. G., Smith A. G., Brooks C. J. W. J. Chromatogr., **133**, 372 (1977).
33. Jeong T. M., Itoh T., Tamura T., Matsumoto T. Lipids, **10**, 634 (1975).
34. Itoh T., Tamura T., Iida T., Matsumoto T. Steroids, **26**, 93 (1975).
35. Itoh T., Tamura T., Ogawa S., Matsumoto T. Steroids, **25**, 729 (1975).
36. Idler D. R., Khalil M. W., Gilbert J. D., Brooks C. J. W. Steroids, **27**, 155 (1976).
37. Ballantine J. A., Williams K. J. Chromatogr., **148**, 504 (1978).
38. Ballantine J. A., Williams K., Morris R. J. J. Chromatogr., **166**, 491 (1978).
39. Novotny M., Lee M. L., Low C. E., Maskarinec M. P. Steroids, **27**, 665 (1976).
40. Halket J. M. J. Chromatogr., **175**, 229 (1979).
41. Tohma M., Nakata Y., Kurosawa T. J. Chromatogr., **171**, 469 (1979).
42. Gambert P., Lallemand C., Archambault A., Maume B. F., Padieu P. J. Chromatogr., **162**, 1 (1979).
43. Wun C. K., Waler R. W., Litsky W. Water Res., **10**, 955 (1976).
44. Melchert H. U. Deut. Lebensm.-Rundsch., **71**, 400 (1975).
45. Patterson G. W., Khalil M. W., Idler D. R. J. Chromatogr., **115**, 153 (1975).
46. Hunter I. R., Walden M. K., Bailey G. F., Heftmann E. Lipids, **14**, 687 (1979).
47. Thowsen J. R., Schroepfer G. J., Jr. J. Lipid Res., **20**, 681 (1979).
48. Hansbury E., Scallen T. J. J. Lipid Res., **21**, 921 (1980).

49. Ansari G. A. S., Smith L. L. J. Chromatogr., **175**, 307 (1979).
50. Redel J. J. Chromatogr., **168**, 273 (1979).
51. Smith W. B., Hogle L. Rev. Latinoam. Quim., **7**, 20 (1976).
52. Pascal R. A., Jr., Farris C. L., Schroepfer G. J., Jr. Anal. Biochem., **101**, 15 (1980).
53. Duncan I. W., Culbreth P. H., Burtis C. A. J. Chromatogr., **162**, 281 (1979).
54. Rees H. H., Donnahey P. L., Goodwin T. W. J. Chromatogr., **116**, 281 (1976).
55. Hunter I. R., Walden M. K., Heftmann E. J. Chromatogr., **153**, 57 (1978).
56. Colin H., Guiochon G., Siouffi A. Anal. Chem., **51**, 1661 (1979).
57. Kobayashi T., Mizuno K., Yasumura M., Okano T. Vitamins, **52**, 217 (1978).
58. Lambert P. W., Lindmark E. A., Spelsberg T. C. Chromatogr. Sci., **10**, 637 (1979).
59. Albertario E., Gnocchi A. Chron. Chim., **55**, 12 (1978).
60. Hofsass H., Alicino N. J., Hirsch A. L., Ameika L., Smith L. D. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **61**, 735 (1978).
61. Mulder F. J., de Vries E. J., Borsje B. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **62**, 1031 (1979).
62. Jones G., DeLuca H. F. J. Lipid Res., **16**, 448 (1975).
63. Ikekawa N., Koizumi N. J. Chromatogr., **119**, 227 (1976).
64. Tarlivata K. A., Sciarrello J. P., Rudy B. C. J. Pharm. Sci., **65**, 1024 (1976).
65. Tsukida K., Kodama A., Saiki K. J. Nutr. Sci. Vitaminol., **22**, 15 (1976).
66. Vanhaelen-Fastré R., Vanhaelen M. J. Chromatogr., **153**, 219 (1978).
67. Tscherne R. J., Capitano G. J. Chromatogr., **136**, 337 (1977).
68. Osadca M., Araujo M. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 993 (1977).
69. Jones G. Clin. Chem., **24**, 287 (1978).
70. Koshy K. T., VanDerSlik A. L. Anal. Biochem., **85**, 283 (1978).
71. Pelc B., Holmees A. L. J. Chromatogr., **173**, 403 (1979).
72. Thompson J. N., Maxwell W. B., L'Abbé M. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 998 (1977).
73. Henderson S. K., Wickroski A. F. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **61**, 1130 (1978).
74. Koshy K. T., VanDerSlik A. L. J. Agr. Food Chem., **27**, 180 (1979).
75. Koshy K. T., VanDerSlik A. L. J. Agr. Food Chem., **25**, 1246 (1977).
76. de Vries E. J., Zeeman J., Esser R. J., Borsje B., Mulder F. J. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **62**, 129 (1979).
77. Vanhaelen-Fastré R., Vanhaelen M. J. Chromatogr., **179**, 131 (1979).
78. Ray A. C., Dwyer J. N., Reagor J. C. J. Ass. Offic. Anal. Chem., **60**, 1296 (1977).
79. Cohen H., Lapointe M. J. Chromatogr. Sci., **17**, 510 (1979).
80. Hunter I. R., Walden M. K., Bailey G. F., Heftmann E. J. Nat. Prod., **44**, 245 (1981).
81. Borisov V. N., Pikova L. A., Zachepilova G. L., Ban'kovskii A. I. Pharm. Chem. J., **10**, 1694 (1977).
82. Cadle L. S., Stelzig D. A., Harper K. L., Young R. J. J. Agr. Food Chem., **26**, 1453 (1978).
83. Jellema R., Elema E. T., Malingré T. M. J. Chromatogr., **189**, 406 (1980).
84. Bushway R. J., Barden E. S., Bushway A. W., Bushway A. A. J. Chromatogr., **178**, 533 (1979).
85. Hunter I. R., Walden M. K., Heftmann E. J. Chromatogr., **198**, 363 (1980).
86. Crabbe P. G., Fryer C. J. Chromatogr., **187**, 87 (1980).
87. Nes W. D., Heftmann E., Hunter I. R., Walden M. K. J. Liquid Chromatogr., **3**, 1687 (1980).
88. Weiss P. A., Winter R., Scherr F., Bayer H. Geburtshilfe Frauenheilkd., **36**, 256 (1976).
89. Carignan G., Lanouette M., Lodge B. A. J. Chromatogr., **135**, 523 (1977).
90. Wortberg B., Woller R., Chulamorakot T. J. Chromatogr., **156**, 205 (1978).

91. Yapo E. A., Barthelemy-Clavey V., Racadot A., Mizon J. J. *Chromatogr.*, **145**, 478 (1978).
92. Musey P. I., Collins D. C., Preedy J. R. K. *Steroids*, **29**, 657 (1977).
93. Jarvenpaa P., Fotsis T., Adlercreutz H. J. *Steroid Biochem.*, **11**, 1583 (1979).
94. Newsome F. E., Kitts W. D. *Steroids*, **26**, 215 (1975).
95. Fransson B., Wahlund K.-G., Johansson I. M., Schill G. J. *Chromatogr.*, **125**, 327 (1976).
96. Hermansson J. J. *Chromatogr.*, **152**, 437 (1978).
97. Roos R. W. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 505 (1976).
98. Dolphin R. J., Pergande P. J. J. *Chromatogr.*, **143**, 267 (1977).
99. Roos R. W. J. *Ass. Offic. Anal. Chem.*, **63**, 80 (1980).
100. Fukuchi H., Tsukiai S., Inoue M. *Yakuzaigaku*, **38**, 102 (1978).
101. Capitano G., Tscherner R. J. *Pharm. Sci.*, **68**, 311 (1979).
102. Krzeminski L. F., Cox B. L., Dunn G. H., III. *J. Agr. Food Chem.*, **26**, 891 (1978).
103. Lin J.-T., Heftmann E. J. *Chromatogr.*, **212**, 239 (1981).
104. Shimada K., Tanaka T., Nambara T. J. *Chromatogr.*, **178**, 350 (1979).
105. Schmidt G. J., Vandemark F. L., Slavin W. *Anal. Biochem.*, **91**, 636 (1978).
106. Roos R. W. J. *Pharm. Sci.*, **67**, 1735 (1978).
107. van der Wal S., Huber J. F. K. J. *Chromatogr.*, **102**, 353 (1974).
108. van der Wal S., Huber J. F. K. J. *Chromatogr.*, **135**, 305 (1977).
109. Keravis G., Lafosse M., Durand M. H. *Chromatographia*, **10**, 678 (1977).
110. van der Wal S., Huber J. F. K. J. *Chromatogr.*, **149**, 431 (1978).
111. Musey P. I., Collins D. C., Preedy J. R. *Steroids*, **31**, 583 (1978).
112. Roman R., Yates C. H., Millar J. F. J. *Chromatogr. Sci.*, **15**, 555 (1977).
113. Fels J. P., Dehennin L., Scholler R. J. *Steroid Biochem.*, **6**, 1201 (1975).
114. Breuer H., Siekmann L. J. *Steroid Biochem.*, **6**, 685 (1975).
115. Björkhem I., Blomstrand R., Svensson L., Tietz F., Carlström K. *Clin. Chim. Acta*, **62**, 385 (1975).
116. Wilson D. W., John B. M., Groom G. V., Pierrepont C. G., Griffiths K. J. *Endocrinol.*, **74**, 503 (1977).
117. Zamecnik J., Armstrong D. T., Green K. *Clin. Chem.*, **24**, 627 (1978).
118. Lafosse M., Keravis G., Durand M. H. J. *Chromatogr.*, **118**, 283 (1976).
119. Hunter I. R., Walden M. K., Heftmann E. J. *Chromatogr.*, **176**, 485 (1979).
120. Shaikh B., Hallmark M. R., Issaq H. J. J. *Liquid Chromatogr.*, **2**, 943 (1979).
121. Cochran R. C., Darney K. J., Jr., Ewing L. L. J. *Chromatogr.*, **173**, 349 (1979).
122. Frischkorn C. G. B., Frischkorn H. E. J. *Chromatogr.*, **151**, 331 (1978).
123. Stan H.-J., Hohls F. W. Z. *Lebensm.-Unters.-Forsch.*, **169**, 266 (1979).
124. Huettemann R. E., Schroff A. P. J. *Chromatogr. Sci.*, **13**, 357 (1975).
125. Tinschert W., Träger L. J. *Chromatogr.*, **152**, 447 (1978).
126. Lisboa B. L., Hoffmann U. J. *Chromatogr.*, **115**, 177 (1975).
127. Sunde A., Stenstad P., Eik-Nes K. B. J. *Chromatogr.*, **175**, 219 (1979).
128. Søndergaard I., Steiness E. J. *Chromatogr.*, **162**, 422 (1979).
129. Oehrle K.-L., Vogt K., Hoffmann B. J. *Chromatogr.*, **114**, 244 (1975).
130. Wal J. M., Peleran J. C., Bories G. J. *Chromatogr.*, **136**, 165 (1977).
131. Verbecke R. J. *Chromatogr.*, **177**, 69 (1979).
132. Puah C. M., Kjeld J. M., Joplin G. F. J. *Chromatogr.*, **145**, 247 (1978).
133. Bicknell D. C., Gower D. B. J. *Steroid Biochem.*, **7**, 451 (1976).
134. Struckmeyer H. F. Z. *Anal. Chem.*, **286**, 244 (1977).
135. Smith A. G., Joannou G. E., Mák M., Uwajima T., Terada O., Brooks C. J. W. J. *Chromatogr.*, **152**, 467 (1978).
136. Nambara T., Kigasawa K., Iwata T., Ibuki M. J. *Chromatogr.*, **114**, 81 (1975).
137. Symes E. K., Thomas B. S. J. *Chromatogr.*, **116**, 163 (1976).

138. Fehér T., Bodrogi L., Fehér K. G., Poteczín E. *Chromatographia*, **10**, 86 (1977).
139. Vogt W., Jacob K., Fischer I., Knedel M. *Z. Anal. Chem.*, **279**, 158 (1976).
140. Schneider H. T., Lisboa B. P., Breuer H. *Z. Anal. Chem.*, **279**, 161 (1976).
141. Edmonds C. G., Brooks C. J. W. *J. Chromatogr.*, **116**, 173 (1976).
142. Kerebel A., Morfin R. F., Berthou F. L., Picart D., Bardou L. G., Floch H. H. *J. Chromatogr.*, **140**, 229 (1977).
143. Dürbeck H. W., Buker I., Scheulen B., Telin B. *J. Chromatogr.*, **167**, 117 (1978).
144. Millington D. S., Buoy M. E., Brooks G., Harper M. E., Griffiths K. *Biomed. Mass Spectrom.*, **2**, 219 (1975).
145. Maynard P. V., Pike A. W., Weston A., Griffiths K. *Eur. J. Cancer*, **13**, 971 (1977).
146. Thompson R. H., Pearson A. M. *J. Agr. Food Chem.*, **25**, 1241 (1977).
147. Björkhem I., Lantto O., Svensson L. *Clin. Chim. Acta*, **60**, 59 (1975).
148. Baba S., Shinohara Y., Kasuya Y. *J. Chromatogr.*, **162**, 529 (1979).
149. Egert D. *J. Chromatogr.*, **135**, 481 (1977).
150. Lin J.-T., Heftmann E., Hunter I. R. *J. Chromatogr.*, **190**, 169 (1980).
151. Purdy R. H., Durocher C. K., Moore P. H., Jr., Rao P. N. — In: *Steroid Analysis by HPLC*, Ed. Kautsky M. P. New York: Dekker, 1980, p. 81.
152. Vandenheuvel F. A. J. *J. Chromatogr.*, **115**, 161 (1975).
153. Vandenheuvel F. A. J. *J. Chromatogr.*, **133**, 107 (1977).
154. Wehner R., Handke A. *J. Chromatogr.*, **177**, 237 (1979).
155. Koshy K. T. *J. Chromatogr.*, **126**, 641 (1976).
156. Björkhem I., Blomstrand R., Lantto O. *Clin. Chim. Acta*, **65**, 343 (1975).
157. Baillie T. A., Sjövall K., Herz J. E., Sjövall J. *Advan. Mass Spectrom. Biochem. Med.*, **2**, 161 (1977).
158. Oesterling T. O. *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 863 (1978).
159. Mattox V. R., Litwiller R. D. *J. Chromatogr.*, **189**, 33 (1980).
160. Scandrett M. S., Ross E. J. *Clin. Chim. Acta*, **72**, 165 (1976).
161. Marcos J. M., Moreno J., Pla Delfina J. M. *Cienc. Ind. Farm.*, **9**, 92 (1977).
162. van der Merwe P. J., Müller D. G., Clark E. C. *J. Chromatogr.*, **171**, 519 (1979).
163. Apter D., Jänne O., Vihko R. *Clin. Chim. Acta*, **63**, 139 (1975).
164. Dyfverman A., Sjövall J. *Anal. Lett.*, **B11**, 485 (1978).
165. Boreham D. I., Vose C. W., Palmer I. F., Brooks C. J. W., Balasubramanian V. *J. Chromatogr.*, **153**, 63 (1978).
166. Jindra A., Kučerová V. *Cas. Lek. Cesk.*, **114**, 927 (1975).
167. Sippell W. G., Putz G., Scheuerecker M. *J. Chromatogr.*, **146**, 333 (1978).
168. Kachel C. D., Mendelsohn F. A. *J. Steroid Biochem.*, **10**, 563 (1979).
169. Sippell W. G., Lehmann P., Hollmann G. *J. Chromatogr.*, **108**, 305 (1975).
170. Golder W. A., Sippell W. G. *J. Chromatogr.*, **123**, 293 (1976).
171. Wilson A., Mason P. A., Fraser R. F. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 611 (1976).
172. Shackleton C. H., Honour J. W. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 199 (1977).
173. Bournot P., Prost M., Maume B. F. *J. Chromatogr.*, **112**, 617 (1975).
174. Tomsouá Z., Gregorová I., Horký K., Dvořáková J. *J. Chromatogr.*, **145**, 131 (1978).
175. Gaskell S. J., Brooks C. J. W. *J. Chromatogr.*, **158**, 331 (1978).
176. Fehér T., Bodrogi L., Váradi A. *J. Chromatogr.*, **123**, 460 (1976).
177. Matin S. B., Amos B. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 923 (1978).
178. Romanoff L. P., Brodie H. J. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 289 (1976).
179. Maume B. F., Millot C., Mesnier D., Patouraux D., Doumas J., Tomori E. *J. Chromatogr.*, **186**, 581 (1979).
180. Gavina G., Moretti G., Alimenti R., Gallinella B. *J. Chromatogr.*, **175**, 125 (1979).

181. Schwedt G., Bussemas H. H., Lippmann C. J. *Chromatogr.*, **143**, 259 (1977).
182. de Vries C. P., Popp-Snijders C., de Kieviet W., Akkerman-Faber A. C. *J. Chromatogr.*, **143**, 624 (1977).
183. Ishii D., Hibi K., Asai K., Nagaya M., Mochizuki K., Mochida Y. *J. Chromatogr.*, **156**, 173 (1978).
184. Rose J. Q., Jusko W. J. *J. Chromatogr.*, **162**, 273 (1979).
185. Kawasaki T., Maeda M., Tsuji A. *J. Chromatogr.*, **163**, 143 (1979).
186. Scott N. R., Dixon P. F. *J. Chromatogr.*, **164**, 29 (1979).
187. Korpi J., Wittmer D. P., Sandmann B. J., Haney W. G. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1087 (1976).
188. Tymes N. W. *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 151 (1977).
189. Burgess C. J. *Chromatogr.*, **149**, 233 (1978).
190. Smith E. J. *Ass. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 812 (1979).
191. Reardon G. E., Caldarella A. M., Canalis E. *Clin. Chem.*, **25**, 122 (1979).
192. Gallant S., Bruckheimer S. M., Brownie A. C. *Anal. Biochem.*, **89**, 196 (1978).
193. Ballerini R., Chinol M., Ghelardoni M. *J. Chromatogr.*, **193**, 413 (1980).
194. Das Gupta V., Ghanekar A. G. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 889 (1978).
195. van den Berg J. H., Mol C. R., Deelder R. S., Thijssen J. H. *Clin. Chim. Acta*, **78**, 165 (1977).
196. Chan T. H., Moreland M., Hum W. T., Birmingham M. K. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 243 (1977).
197. Farhi R. L., Monder C. *Anal. Biochem.*, **90**, 58 (1978).
198. Loo J. C. K., Butterfield A. G., Moffatt J., Jordan N. J. *Chromatogr.*, **143**, 275 (1977).
199. Muller K. H., Stuber B. *Pharm. Acta Helv.*, **53**, 124 (1978).
200. Garg D. C., Ayres J. W., Wagner J. G. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **18**, 137 (1977).
201. Smith M. D., Hoffman D. J. *J. Chromatogr.*, **168**, 163 (1979).
202. Higgins J. W. *J. Chromatogr.*, **115**, 232 (1975).
203. Gordon G., Wood P. R. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **14**, 30 (1977).
204. Rysfeldt A., Tonnesson M., Nilsson E., Wikby A. *J. Steroid Biochem.*, **10**, 317 (1979).
205. Tsuei S. E., Ashley J. J., Moore R. G., McBride W. G. *J. Chromatogr.*, **145**, 213 (1978).
206. Li Wan Po A., Irwin W. J., Yip Y. W. *J. Chromatogr.*, **176**, 399 (1979).
207. Neurath G. B., Ambrosius D. *J. Chromatogr.*, **163**, 230 (1979).
208. Abdou H. M., Ast T. M., Cioffi F. J. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1397 (1978).
209. Douglas S. L. *Chromatogr. Sci.*, **9**, 917 (1978).
210. Fitzpatrick F. A. *Advan. Chromatogr.*, **16**, 37 (1978).
211. Gregorová I., Tomsová Z., Macek K. *Ergeb. Exp. Med.*, **20**, 51 (1976).
212. Okumura T., Azuma A. *Bunseki Kagaku*, **28**, 235 (1979).
213. Treiber L. R. *J. Chromatogr.*, **124**, 69 (1976).
214. Hara S., Mibe K. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2850 (1975).
215. Mattox V. R., Litwiler R. D., Carpenter P. C. *J. Chromatogr.*, **175**, 243 (1979).
216. Scott R. M., Sawyer R. T. *Microchem. J.*, **20**, 309 (1975).
217. Bajaj K. L., Ahuja J. L. *J. Chromatogr.*, **172**, 417 (1979).
218. Kohli J. C., Arora A. K. *Ann. Chim.*, **2**, 67 (1977).
219. Kohli J. C., Dhaliwal N. S. *Riechst., Aromen, Kosmet.*, **27**, 132 (1977).
220. Yamaguchi Y. *J. Chromatogr.*, **163**, 253 (1979).
221. Bradlow H. L. *Steroids*, **30**, 581 (1977).
222. Setchell K. D., Almé B., Axelsson M., Sjövall J. *J. Steroid Biochem.*, **7**, 615 (1976).
223. Axelsson M., Sjövall J. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 683 (1977).
224. Vose C. W., Boreham D. R., Lewis C. J. *J. Chromatogr.*, **179**, 187 (1979).
225. Germeau P., Duviolier J. *J. Chromatogr.*, **129**, 471 (1976).

226. Gips H., Korte K., Meinnecke B., Bailer P. J. *Chromatogr.*, **193**, 322 (1980).
227. Apter D., Jänne P., Karvonen P., Vihko R. *Clin. Chem.*, **22**, 32 (1976).
228. Fairclough R. J., Rabjohns M. A., Peterson A. J. *J. Chromatogr.*, **133**, 412 (1977).
229. Hara S., Hayashi S. J. *Chromatogr.*, **142**, 689 (1977).
230. Hara S., Hirasawa M., Miyamoto S., Ohsawa A. J. *Chromatogr.*, **169**, 117 (1979).
231. Hesse C., Hövermann W. *Chromatographia*, **6**, 345 (1973).
232. van den Berg J. H. M., Milley J., Vonk N., Deelder R. S. J. *Chromatogr.*, **132**, 421 (1977).
233. O'Hare M. J., Nice E. C., Magee-Brown R., Bullman H. J. *Chromatogr.*, **125**, 357 (1976).
234. Nice E. C., O'Hare M. J. *J. Chromatogr.*, **166**, 263 (1978).
235. Kautsky M. P., Hagerman D. D. *Chromatogr. Sci.*, **10**, 123 (1979).
236. Schöneshöfer M., Dulce H. J. *J. Chromatogr.*, **164**, 17 (1979).
237. Cochran R. C., Ewing L. L. *J. Chromatogr.*, **173**, 175 (1979).
238. Satyaswaroop P. G., Lopez de la Osa E., Gulpide E. *Steroids*, **30**, 139 (1977).
239. Horikawa R., Tanimura T., Tamura Z. *J. Chromatogr.*, **168**, 526 (1979).
240. Loppinet V., Siest G. *Pharm. Biol.*, **9**, 437 (1975).
241. Axelson M. J. *Steroid Biochem.*, **8**, 693 (1977).
242. Axelson M. *Anal. Biochem.*, **86**, 133 (1978).
243. Nambara T., Iwata T., Kigasawa K. *J. Chromatogr.*, **118**, 127 (1976).
244. Jacob K., Vogt W. *J. Chromatogr.*, **150**, 339 (1978).
245. Miyazaki H., Ishibashi M., Itoh M., Yamashita K., Nambara T. *J. Chromatogr.*, **133**, 311 (1977).
246. Quilliam M. A., Westmore J. B. *Anal. Chem.*, **50**, 59 (1978).
247. Phillipou G. *J. Chromatogr.*, **129**, 384 (1976).
248. Hosoda H., Yamashita K., Sagae H., Nambara T. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2118 (1975).
249. Kelly R. W., Taylor P. L. *Anal. Chem.*, **48**, 465 (1976).
250. Gaskell S. J., Brooks C. J. W. *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 111 (1976).
251. Blair I. A., Phillipou G. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 201 (1978).
252. Edwards R. W. H. *J. Chromatogr.*, **153**, 1 (1978).
253. Edwards R. W. H. *J. Chromatogr.*, **154**, 183 (1978).
254. Hurter P., van Ree P. *J. Chromatogr.*, **169**, 93 (1979).
255. Zielinski W. L., Jr., Johnston K., Muschik G. M. *Anal. Chem.*, **48**, 907 (1976).
256. Janini G. M., Manning W. B., Zielinski W. L., Jr., Muschik G. M. *J. Chromatogr.*, **193**, 444 (1980).
257. Thomas B. S. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **3**, 241 (1980).
258. Mathiesen U., Staib W. *Chromatographia*, **10**, 70 (1977).
259. Berthou F., Picart D., Bardou L., Floch H. H. *J. Chromatogr.*, **118**, 135 (1976).
260. Madani C., Chambaz E. M., Rigaud M., Durand J., Chebroux P. *J. Chromatogr.*, **126**, 161 (1976).
261. Krupčík J., Rutten G. A., Rijks J. A. *Chem. Zvesti.*, **30**, 469 (1976).
262. Sandra P., Verzele M., Vanluchene E. *Chromatographia*, **8**, 499 (1975).
263. Novotny M., Maskarinec M. P., Steverink A. T., Farlow R. *Anal. Chem.*, **4**, 468 (1976).
264. Ludwig H., Reiner J., Spiteller G. *Chem. Ber.*, **110**, 217 (1977).
265. Pfaffenberger C. D., Horning E. C. *J. Chromatogr.*, **112**, 581 (1975).
266. Reiner J., Spiteller G. *Monatsh. Chem.*, **106**, 1415 (1975).
267. Fantl V., Gray C. H. *Clin. Chim. Acta*, **79**, 237 (1977).
268. Leunissen W. J., Thijssen J. H. H. *J. Chromatogr.*, **146**, 365 (1978).
269. Phillipou G., Seamark R. F., Cox L. W. *Aust. N. Z. J. Med.*, **8**, 63 (1978).

270. Ludwig H., Spitteller G., Matthaei D., Scheler F. J. *Chromatogr.*, **146**, 381 (1978).
271. Pfaffenberger C. D., Malinak L. R., Horning E. C. J. *Chromatogr.*, **158**, 313 (1978).
272. Millington D. S. J. *Steroid Biochem.*, **6**, 239 (1975).
273. Siekmann L., Siekmann A., Breuer H. *Advan. Mass Spectrom. Biochem. Med.*, **2**, 419 (1977).
274. Sturm G., Stähler E. Z. *Anal. Chem.*, **279**, 164 (1976).
275. Seamark R. F., Phillipou G., McIntosh J. E. J. *Steroid Biochem.*, **8**, 885 (1977).
276. Lisboa B. P., Schneider H. T., Breuer H. *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. **82**, 57 (1976).
277. Menger F. M., Hopkins J. J., Cox G. S., Maloney M. J., Bayer F. L. *Anal. Chem.*, **50**, 1135 (1978).
278. Sjövall J. — In: *Liver and Bile*, Falk Symp. No. 23/Eds. Bianchi L., Gerok W., Sickinger K. MD, Baltimore: University Park Press, 1977, p. 67.
279. Eneroth P. — In: *Lipid Chromatographic Analysis*. Vol. 3, 2nd Edn. New York: Dekker, 1976, p. 819.
280. Ikawa S., Goto M. J. *Chromatogr.*, **114**, 237 (1975).
281. Spears R., Vukusich D., Mangat S., Reddy B. S. J. *Chromatogr.*, **116**, 184 (1976).
282. Ikawa S. J. *Chromatogr.*, **117**, 227 (1976).
283. Beher W. T., Sanfield J., Stradnieks S., Lin G. J. J. *Chromatogr.*, **155**, 421 (1978).
284. Chavez M. N. J. *Chromatogr.*, **162**, 71 (1979).
285. Chavez M. N., Krone C. L. J. *Lipid Res.*, **17**, 545 (1976).
286. Beke R., de Weerd G. A., Parijs J., Huybrechts W., Barbier F. *Clin. Chim. Acta*, **70**, 197 (1976).
287. Goswami S. K., Frey C. F. *Biochem. Med.*, **17**, 20 (1977).
288. Goswami S. K., Frey C. F. J. *Chromatogr.*, **145**, 147 (1978).
289. Touchstone J. C., Levitt R. E., Soloway R. D., Levin S. S. J. *Chromatogr.*, **178**, 566 (1979).
290. Batia A. K., Salen G., Shefer S. J. *Chromatogr.*, **168**, 557 (1979).
291. Touchstone J. C., Levitt R. E., Levin S. S., Soloway R. D. *Lipids*, **15**, 386 (1980).
292. Parmentier G., Eyssen H. J. *Chromatogr.*, **152**, 285 (1978).
293. Raedsch R., Hofmann A. F., Tserng K. *Lipid Res.*, **20**, 796 (1979).
294. Macdonald I. A. J. *Chromatogr.*, **136**, 348 (1977).
295. Jirsa M., Soldátová H. J. *Chromatogr.*, **157**, 449 (1978).
296. Rocchi E., Salvioli G. *Minerva Gastroenterol.*, **22**, 222 (1976).
297. Taylor W. A., Blass K. G., Ho C. S. J. *Chromatogr.*, **168**, 501 (1979).
298. Kim H. K., Kritchevsky D. J. *Chromatogr.*, **117**, 222 (1976).
299. Belobaba D. T., Carlson G. L., La Russo N. F. J. *Chromatogr.*, **172**, 410 (1979).
300. Beke R., de Weerd G. A., Barbier F. J. *Chromatogr.*, **193**, 504 (1980).
301. Parris N. A. J. *Chromatogr.*, **133**, 273 (1977).
302. Bloch C. A., Watkins J. B. J. *Lipid Res.*, **19**, 510 (1978).
303. Laatikainen T., Lehtonen P., Hesso A. *Clin. Chim. Acta*, **85**, 145 (1978).
304. Baylocq D., Guffroy A., Pellerin F., Ferrier J. P. C. R. *Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C*, **286**, 71 (1978).
305. Shaw R., Elliott W. H. *Lipids*, **13**, 971 (1978).
306. Goto J., Kato H., Nambara T. J. *Liquid Chromatogr.*, **3**, 645 (1980).
307. Parris N. *Anal. Biochem.*, **100**, 260 (1979).
308. Shimada K., Hasegawa M., Goto J., Nambara T. J. *Chromatogr.*, **152**, 431 (1978).
309. Almé B., Bremmelgaard A., Sjövall J., Thomassen P. J. *Lipid Res.*, **18**, 339 (1977).

310. Goto J., Hasegawa M., Kato H., Nambara T. Clin. Chim. Acta, **87**, 141 (1978).
311. Miyazaki S., Tanaka H., Horikawa R., Tsuchiya H., Imai K. J. Chromatogr., **181**, 177 (1980).
312. Goto J., Kato H., Nambara T. Lipids, **13**, 908 (1978).
313. Okuyama S., Uemura D., Hirata Y. Chem. Lett., 1976, 679.
314. Shaikh B., Pontzer N. J., Molina J. E., Kelsey M. I. Anal. Biochem., **85**, 47 (1978).
315. Stellaard F., Hachey D. L., Klein P. D. Anal. Biochem., **87**, 359 (1978).
316. Kuksis A. — In: Lipid Chromatographic Analysis./Ed. Marinetti G. V. 2nd Edn., Vol. 2. New York: Dekker, 1976, p. 479.
317. Tint G. S., Dayal B., Batta A. K., Shefer S., Cheng F. W., Salen G., Mosbach E. H. J. Lipid Res., **19**, 956 (1978).
318. Miyazaki H., Ishibashi M., Yamashita K. Biomed. Mass Spectrom., **5**, 469 (1978).
319. Karlaganis G., Paumgartner G. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **1**, 54 (1978).
320. Campbell R. L., Ganitt J. S., Nigro N. D. J. Chromatogr., **155**, 427 (1978).
321. Brydon W. G., Tadesse K., Smith D. M., Eastwood M. A. J. Chromatogr., **172**, 450 (1979).
322. Harris W. S., Marai L., Myher J. J., Subbiah M. T. R. J. Chromatogr., **131**, 437 (1977).
323. Szczepanik P. A., Hachey D. L., Klein P. D. J. Lipid Res., **19**, 280 (1978).
324. Yousef I. M., Fisher M. M., Myher J. J., Kuksis A. Anal. Biochem., **75**, 538 (1976).
325. Galeazzi R., Kok E., Javitt N. J. Lipid Res., **17**, 288 (1976).
326. Imai K., Tamura Z., Mashige F., Osuga T. J. Chromatogr., **120**, 181 (1976).
327. Musial B. C., Williams C. N. J. Lipid Res., **20**, 78 (1979).
328. Child P., Kuksis A., Myher J. J. Can. J. Biochem., **57**, 639 (1979).
329. Campbell C. B., McGuffie C., Powell L. W. Clin. Chim. Acta, **63**, 249 (1975).
330. Takahashi M., Raicht R. F., Sarwal A. N., Mosbach E. H., Cohen B. I. Anal. Biochem., **87**, 594 (1978).
331. Kuramoto T., Cohen B. I., Mosbach E. H. Anal. Biochem., **71**, 481 (1976).
332. Ruh M. F., Black C. J. Chromatogr., **116**, 480 (1976).
333. Hardman R., Benjamin T. V. J. Chromatogr., **131**, 468 (1977).
334. Mayer R. T., Svoboda J. A. Steroids, **31**, 139 (1978).
335. Poole C. F., Singhawangcha S., Zlatkis A. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **1**, 96 (1978).
336. Hashimoto M. Kagaku no Ryoiki, Zokan, **109**, 127 (1976).
337. Wilson I. D., Bielby C. R., Morgan E. D., McLean A. E. M. J. Chromatogr., **194**, 343 (1980).
338. Hori M. Steroids, **14**, 33 (1969).
339. Hori M. W. J. Chromatogr., **129**, 447 (1976).
340. Lafont R., Martin-Sommé G., Chambet J.-C. J. Chromatogr., **170**, 185 (1979).
341. Holman G. M., Meola R. W. Insect Biochem., **8**, 275 (1978).
342. Ogawa S., Yoshida A., Kato R. Chem. Pharm. Bull., **25**, 904 (1977).
343. Bielby C. R., Gande A. R., Morgan E. D., Wilson I. D. J. Chromatogr., **194**, 43 (1980).
344. Delbecque J. P., Prost M., Maume B. F., Delachambre J., Lafont R., Mauchamp B. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D, **281**, 309 (1975).
345. Gustafson M. E., Nicholas A. W., Rosazza J. P. J. Chromatogr., **137**, 465 (1977).
346. Hunter I. R., Walden M. K., Heftmann E., Glotter E., Kirson I. J. Chromatogr., **170**, 437 (1979).

- 347. *Szeleczky Z. J. Chromatogr.*, **178**, 453 (1979).
- 348. *Yoshioka K., Fullerton D. S., Rohrer D. C. Steroids*, **32**, 511 (1978).
- 349. *Clarke C. J., Cobb P. H. J. Chromatogr.*, **168**, 541 (1979).
- 350. *Karting T., Kobosil P. J. Chromatogr.*, **138**, 238 (1977).
- 351. *Faber D. B. J. Chromatogr.*, **142**, 421 (1977).
- 352. *Faber D. B., de Kok A., Brinkman U. A. T. J. Chromatogr.*, **143**, 95 (1977).
- 353. *Storstein L. J. Chromatogr.*, **117**, 87 (1976).
- 354. *Lindner W., Frei R. W. J. Chromatogr.*, **117**, 81 (1976).
- 355. *Cobb P. H. Analyst (London)*, **101**, 768 (1976).
- 356. *Erni F., Frei R. W. J. Chromatogr.*, **130**, 169 (1977).
- 357. *Castle M. C. J. Chromatogr.*, **115**, 437 (1975).
- 358. *Shimada K., Hasegawa M., Hasebe K., Fujii Y., Nambara T. J. Chromatogr.*, **124**, 79 (1976).
- 359. *Verpoorte R., Phan-quôc-Kinh, Baerheim Svendsen A. J. Nat. Prod.*, **43**, 347 (1980).
- 360. *Nachtmann F., Spitzzy H., Frei R. W. J. Chromatogr.*, **122**, 293 (1976).
- 361. *Gfeller J. C., Frey G., Frei R. W. J. Chromatogr.*, **142**, 271 (1977).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абиатан** 243
Агликоны 259
Адренокортикостероиды 305
Адренокортикотропный гормон 64
Азафрин 252
Аланин 38, 44, 46, 49, 60, 61, 72, 74, 78, 80—82, 88, 91
Алкалоиды 295
Альдаднон 306
Альдостерон 306, 307
Амилагенин 295
Аминовалериановая кислота 86
Аминоизомасляная кислота 38, 70, 72, 76, 78
Аминокислоты 37
 ацилирование 75
 ВЭЖХ 43
 газовая хроматография 69
 дансильные производные 51, 57
 ДНФ-производные 51
 ионообменная хроматография 37, 43
 масс-спектрометрия 85
 метилтиногидантионовые производные 51
 триметилсилильные производные 70
 ФТГ-производные 51, 54
Амогенин 295
Анаболик 300, 302
Андростана производные 300
Андростандион 301
Андростендион 301, 302
Андростенол 302
Андростерон 300—301
Ангиотензин 61, 64
Анисовый альдегид 255
Антиоксиданты 262
Апокаротинали 252
Арахидоновая кислота 145, 181
Аргинин 44, 46, 48, 49, 60, 61, 70—72, 74, 78, 80, 88
Аспарагин 44, 49, 72, 78, 81
Аспарагиновая кислота 44, 46, 49, 72—74, 80, 88
Астацин 253
Астаксантин 251
Ауроксантин 250

Бактериоруберин 250
Белки 104
 адсорбционная хроматография 110
 аффинная хроматография 110
 ВЭЖХ 111
 гель-хроматография 106
 ионообменная хроматография 108
 молекулярная масса 108
 электрофорез 111
Бетаметазон 307
Бетулапrenoлы 254
Биксин 252
Биоавтография 25
Бисаболен 240
Биурен 244
Бомбезин 64
Борнсол 234, 236
Боурбонен 240
Брадикинин 61
Брассикастерин 288
Будезонид 307
Булгарен 240
Бумажная хроматография 22

Вазопрессин 64
Вазотоцин 64
Вакценовая кислота 168
Валенцен 240
Валин 44, 46, 57, 58, 73, 74, 78, 80—83, 88
Верамин 296
Вербенол 234

- Ветивенен 240
Видеоденситометр 251
Винная кислота 236
Виолаксантин 253
Витамины
 А *см. также* Ретиноиды 261, 264
 D *см. также* Эргокальциферол 263, 264, 293
 Е *см. также* Токоферолы 263, 264
 К *см. также* Менахиноны 267
Витаминοиды 314, 315
Витаферин А 315
- Газовая хроматография 25
Галактозилдиацилглицерины 159, 163, 164, 166, 202
Галактозилцерамиды 162, 164, 165
Галактоцереброзиды 203
Ганглиозиды 160, 161, 165, 166, 203
Гастрин 61, 64
Гексозилцерамиды 160, 162, 164—166
Гель-электрофорез 112
Гематозид 160
Гемитерпеновые спирты 231
Гемитерпены 230, 256
Генины 316, 317
Гераниаль 234
Геранилгераниевая кислота 244
Геранилгераниол 252, 255
Гераниол 234, 256
Гиббереллинглюкозиды 259
Гистидин 44, 46, 49, 52, 70, 72, 78, 81, 92, 93
Гитоксин 316
Гликозиды сердечные 315
Гликозилцерамиды 162, 202, 203
Гликолипиды 159, 163, 201, 207
 выделение 159
 ВЭЖХ 203
 ГЖХ 202
 разделение на классы 159, 163
 хроматография на носителях, со-
 держащих ионы серебра 201
Гликосфинголипиды 162, 165, 166
Гликопротеины 254
Глицериды *см.* Ацилглицерины
Глицерина производные 143
Глицин 44, 46, 49, 60, 61, 70—72, 78, 80, 88, 92, 93, 201
Глицерогликолипиды 162, 164
Глицерофосфолипиды 197, 207
Глобозиды 160
Глутамин 44, 46, 49, 70, 72, 78, 81, 86, 87
Глутаминовая кислота 44, 46, 49, 70—72, 74, 76, 80, 86—88
Глюкагон 61, 64, 67
Глюкозидуренаты 300
Глюкозилцерамиды 164
Глюкоцереброзид 159, 164, 203
- Дегидроапокаротиналь 252
Дегидрокортикостерон 307
Дегидроэпиандростерон 300—302
Дезоксивитаферин 315
Дезоксикортикостерон 307
Дезоксикортизол 307
Декапено-β-каротин 253
Дексаметазон 307
Десмостерин 288
Детекторы для хроматографии
 газовой 43
 жидкостной 50
Диапокаротин 252
Диапокаротиновая кислота 252
Диапонецропорин 252
Диапофитон 252
Диапофитофлуен 252
Диацилглицерины 137, 138
Дивалин 61
Дигидрокарвсол 234
Дигидрокарвон 234
Дигидроланостерин 289
Дигидроэквиленин 298
Дигитоксигенин 316, 317
Дигитоксин 316
Дигоксигенин 316, 317
Диметилаллиловый спирт 256
Диметилгистидин 72
Диметилкроцетин 252
Диметилмсахинон 268
Диметилсульфит 75
Диметионин 61
Диметоксизеаксантин 253
Диоксифенилаланин 39, 57, 74
Диосгенин 295
Дипептиды 41, 62
Диск-электрофорез 112, 122
Дитерпены 243, 249
 ГЖХ 243
 колоночная хроматография 245
 тонкослойная хроматография 244
Дитриптофан 61
Диэтилкроцетин 252
Долихолы 254
Допамин 33
Дьенколева кислота 72

- Желчные кислоты** 310
Жирные кислоты свободные 137, 139, 141, 144, 164, 205
ацетиленовые 173
выделение 167
ГЖХ 170
гидроксильированные 204
из печени трески 175
окисленные 176
2-оксипроизводные 144
полиеновые 169, 172
эфиры 207
- Зеакаротин** 252
Зеаксантин 250, 251, 253
- Изоаминомасляная кислота** 39
Изоборнеол 234
Изодегидрокарвеол 234
Изозеаксантин 253
Изократический режим 18
Изокриптоксантин 253
Изoleyцин 44, 46, 49, 57, 58, 72, 74, 75, 78, 80, 82, 88
Изоментол 234
Изоментон 233, 234
Изоникотинилгидразоны 309
Изопентенол 231, 256
Изопинокамфол 234
Изопинокамфон 234
Изопрен 232
Изопреноиды 230
Изосативен 240
Изотахофорез 111, 120
Изотуйянол 234
Изотуйон 234
Изоэлектрическая фокусировка 111, 124
Иланген 240
Индолил-3-уксусная кислота 85
Инокостерон 313
Инсулин 67
Иридоиды 259—261
- Кадинен** 240
Казбен 244
Каларен 240
Кампестанол 288
Кампестерин 287, 288
Камфора 234, 236
Кандерон 307
Кантаксантин 251, 253
Капксантин 253
Карбоксилметилцистеин 44
Карвакрол 234
Карвеол 234
Карвон 234
Кариофиллен 240
Каротинин 252
Каротиноиды цитрусовых 253
Каротинон 253
Каротины 249, 252, 260
Катаксантин 251
Кауран 243
Каурен 244
Кауреналь 244
Кауреновая кислота 244
Кауренол 244
Кетоацидоз 82
Кетостероиды 309
Кетозэстрадиол 298
Кинуренин 72, 73
Колоночная хроматография 14
Копаен 240
Кортизол 306, 307
Кортизон 306, 307
Кортикостероиды 305
Кортикостерон 306, 307
Кортюевая кислота 307
Криптоксантин 253
Кроцетин 252
Круговая хроматография 22
Ксантофиллы 249, 251
Кубебен 240
Кукурбитацены 247
Куперен 240
Куркумен 240
- Лабдан** 243
**Лазерное электрофоретическое рас-
сечение** 112
Лактоны 314
Ланостерин 252, 289
Лантионин 72
Левопиларовая кислота 243
Лейцин 44, 46, 49, 57, 60, 61, 72, 74, 78, 80—82, 88
Лецитин 207, 263
Лизин 44, 49, 71, 72, 74, 78, 80, 81
Ликоперсен 252
Ликопин 249, 250, 252
Лимонен 234, 238
Лимоноиды 248
Линалоол 234
Линоэлаидиновая кислота 175
Липидов определение общего состава 204
ВЭЖХ 208
ГЖХ 207
тонкослойная хроматография 204
Липиды,
выделение неполярных липидов 137

- разделение
 на индивидуальные соединения 167
 полярных и неполярных липидов 135
 различных классов 135
экстракция 131
элюирование 133
Лонгифолен 240
Лонгигиклен 240
Люлиберин 61
Лютеины 250, 251
- Макистерон** 313
Мевалоновая кислота 230, 256
Меланотропин 61
Меленгэстерол 305
Менадион 268, 269
Менахиноны 268, 269
Ментадиены 237
Ментен 236
Ментенол 234
Ментол 234, 236
Ментон 234, 236
Ментофуран 234
Метилазафрин 252
Метилбиксин 252
Метилгистидин 39, 52, 71, 72
Метилхолестерин 288
Метилстерины 290
Метилцистеин 44
Метионин 44, 46, 48, 49, 57, 60, 61, 70, 72, 74, 78, 80, 81
Метионинсульфон 44
Миколовая кислота 144, 168, 174
Миртеналь 234
Миртелол 234
Мирцен 234
Многофазный зонный электрофорез 122
Монеллин 89
Монотерпены 232
 ГЖХ 232
 колоночная хроматография 238
 тонкослойная хроматография 237
Мутанты табака 249
Мууролен 240
- Нейротензин** 61
Нейроспорин 252
Необактериоруберины 250
Неодигидрокарвеол 234
Неонизодигидрокарвеол 234
Неоизоментол 234
Неоизогуйанол 234
Неоксантин 253
Неолиотеин 250
Неоментол 234
Неотуйанол 234
Неохром 250
Нераль 234
Нерол 234
Норвалин 57
Норлейцин 44, 57, 78, 86
Норпиннефрин 39
- Оксиандростаны** 302
Оксивитакон 315
Оксизолейцин 38
Оксиндолилуксусная кислота 38, 85
Оксилейцин 86
Оксилизин 39, 72
Оксиметилглутарилкофермент А 230
Оксипролин 39, 44, 72, 74, 78
Окситоцин 61, 64—66
Октадекановая кислота 165
Олеиновая кислота 175
Олигопептиды 37
 ВЭЖХ 59, 66, 67
 газовая хроматография 68
 ионообменная хроматография 37
 масс-спектрометрия 88
Орнитин 72, 78, 80, 92
- Палустровая кислота** 243
Пальмитиновая кислота 175
Пентааланин 61
Пептиды 37
Перфторалкановые кислоты 60
Пимаран 243
Пинен 234, 238
Пипеколиновая кислота 73
Пиперитенон 234
Пиперитол 234
Пиперитон 234
Пироветивен 240
Полигексозилцерамиды 201
Полипренолы 254
Понастерон 313
Прегнана производные 303
Прегнандиол 304
Прегнандион 303
Прегнендиол 304
Преднизолон 306, 307
Преднизон 306
Пренилфосфаты 254
Прескваленол 247, 255, 256
Префитоен 256

- Прогестерон 303—306
Пролин 39, 44, 49, 57, 59, 73, 74, 78, 80, 88
Простагландины 176
 выделение 139, 140, 145
 ВЭЖХ 180
 ГЖХ 178
 хроматография на носителях, со-
 держащих ионы серебра 176
Психозин 164
Птеростерон 313
Пулегон 234
- Реагент Гиббса 265
Ретиналь 252, 261—264
Ретиновая кислота 262—264
Ретиноиды 261—264
Ретинол 249, 252, 262—264
Рециклическая хроматография 18
Родамин G 266
- Сабинсен 233, 234, 237, 238
Сандарокопимарадиен 244
Сапогенины 259, 295
Сапонины 259
Саркозин 73
Сарсасапогенин 295
Сативен 240
Секонридоиды 259—261
Секостерины 257
Серин 44, 46, 49, 73, 74, 78, 80, 81
Серотонин 38, 85
Сиаловая кислоты 165
Сиалоганглиозиды 163
Синтетические жирные кислоты 137, 139
Ситостерин 288, 292
Сквален 247, 252, 253
Смиллагенин 295
Смоляные кислоты 243, 244
Соланидин 296
Соласодин 296
Соматостатин 61, 64, 66
Сорбиновая кислота 194
Соя-сапогенолы 247, 248
Стеаронилглицерин 192
Стерины 287
Стеронды 286
Стигмастадиенол 289
Стигмастанол 289
Стигмататриенол 289
Стигмастенол 289
Стигмастерин 252, 289, 292
Сульфатиды 159, 164, 166, 203
Сульфолипиды 159
Сфинголипиды 131, 164, 165, 207
- Сфингомиелины 148, 197, 207
 выделение 148
 ВЭЖХ 199
 хроматография на носителях, со-
 держащих ионы серебра 198
- Тафтсин 61
Таурин 70
Тауронокъюгаты 310
Таурохолаты 312
Тенболол 302
Термофрактография 22
Терпеновые спирты 235
Терпены 229
 глицозилированные 259
 фосфорилированные 256
Терпинен 234, 237, 238
Терпиненол 234
Терпинеол 234
Терпинолен 234
Тестостерон 299—302, 306
Тетратерпены 248
 ВЭЖХ 248
 ГЖХ 253
 тонкослойная хроматография 251
Тимол 234
Тиогистидин 73
Тионилхлорид 75
Тирозин 39, 44, 49, 57, 58
Тиролибсрин 61, 66
Токоферолы 263—267
Томатиденол 296
Томатидин 296
Томатиллидин 296
Торуляродин 253
Трахилобан 244
Тренболол 301
Треонин 44, 46, 49, 73, 74, 78, 80, 81, 88
Триацилглицерины 138
Триглицин 61, 74
Триодтиронин 86
Трилейцин 61
Триметилсидильные производные ами-
 нокислот 70
Триметилсидилизоксантин 253
Триметилсидилхолестерин 290
Тритирозин 61
Трифенилаланин 61
Туйанол 234
Туйен 234, 237, 238
Туйон 234
Туйопсен 240
- Убихиноны 255
Углеводороды 137
Умбеллулол 234
Ундекапренол 254

- Фарнезен 240
Фарнезол 241, 256, 258
Фенхен 234, 238
Фенхол 234
Фенхон 234, 238
Физалаемин 61
Фикапrenoлы 254
Филлохинон 268
Физалаемин 61
Фитановая кислота 243
Фитосн 249, 252
Фитол 252
Фитофлуен 252
Фосфатидилглицерин 148—159, 199
Фосфатидилинозит 148—159, 198, 205
Фосфатидилсерин 148—159, 198, 205
Фосфатидилхолин 147, 149—159, 180, 198, 205, 207
Фосфатидилэтаноламин 148—159, 161, 199
Фосфолипаза 198
Фосфолипиды 131, 161, 164, 198, 205, 207
 плазмы 209
 разделение по классам 147
Фосфомевалонат 256
Фоторецепция 261
- Хлоропласты 202, 248, 251
 шпината 253
Хлорофилл 249, 251, 253
 ВЭЖХ 248
 тонкослойная хроматография 251
Холестадиенол 288
Холестан 252
Холестанол 288
Холестанон 291
Холестенол 288
Холестенон 291
Холестерин 205, 252, 288, 290
 выделение 137, 141, 143
 эферы 137, 208, 209
Хромарод 23
Хроматобар 23
- Цедрен 240
Церамидоолигосахариды 165
Церамиды 194
 адсорбционная хроматография 194
 ВЭЖХ 197
 выделение 159, 162, 164
 ГЖХ 196
 хроматография на носителях, содержащих ионы серебра 195
Цереброзиды 159, 162, 164, 166, 202, 203
- Церулеин 61
Цизаен 240
Циклогексилтридекановая кислота 172
Циклогексилундекановая кислота 172
Циклоконакамфен 240
Циклосативен 240
Цимен 234, 237
Цименол 234
Циннабериен 240
Цинеол 234
Цистатионин 72
Цистеин 46, 49, 57, 72, 78, 80
Цистеиновая кислота 44, 58, 72
Цистин 74
Цитронеллаль 234
Цитронеллол 234
Цитруллин 70, 72
- Эквиленин 313
Эквилин 298
Экдизон 313
Экдистероиды 313
Элаидиновая кислота 175
Эледоизин 61
Электрофорез 11, 27
 аппаратура 116
 белков 111
 зонный 12, 27, 111, 119
Эндорфин 61, 64
Энкефалин 61
Эпиандростерон 300—302
Эпитестостерон 301
Эпиэстриол 198
Эпоксимаенахинон 269
Эпоксифиллохинон 269
Эргокальциферол 292
Эргостадиенол 288
Эргостатриенол 288
Эргостенол 287, 288
Эргостерин 252, 288, 292
Эруковая кислота 144
Эстолиды 193
Эстрадиенол 299
Эстрана производные 297
Эстриол 298, 299
Эстрогены 297, 299
Эстрон 298, 299
Эсхининенон 252
Этионин 57
Этнохоландион 300, 301
Этнохоланолон 300—302
Этоксикарбонилгистидин 80
- Ювенильный гормон 241
- Ятробидс 160, 161

Содержание

<i>Предисловие редактора перевода</i>	5
<i>Предисловие</i>	7
<i>Предисловие редактора американского издания</i>	9
<i>Предисловие к русскому изданию</i>	10
 Глава 1. Обзор методов хроматографии и электрофореза. <i>Эрих Хефтман</i>	11
1.1. Классификация	11
1.2. Колоночная хроматография	14
1.3. Плоскостная хроматография	21
1.4. Газовая хроматография	25
1.5. Электрофорез	27
1.6. Выводы	30
Литература	34
 Глава 2. Аминокислоты и олигопептиды. <i>Томас Кастер,</i> <i>Алонс Нидервизер</i>	37
2.1. Введение	37
2.2. Ионообменная хроматография	37
2.2.1. Аминокислоты и олигопептиды	37
2.2.2. Разделение аминокислот, дипептидов и олигопептидов	41
2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография аминокислот и пептидов	43
2.3.1. Детекторы	43
2.3.1.1. Ультрафиолетовые детекторы	44
2.3.1.2. Флуориметрические детекторы	45
2.3.1.3. Электрохимические детекторы	45
2.3.1.4. Масс-спектрометры	46
2.3.2. Разделение аминокислот	51
2.3.3. Разделение энантиомеров аминокислот	56
2.3.4. Разделение олигопептидов	59
2.4. Газовая хроматография	68
2.4.1. Газовая хроматография аминокислот	69
2.4.1.1. Очистка препаратов	69
2.4.1.2. Получение производных	69
2.4.1.3. Триметилсилильные производные	70
2.4.1.4. Эфиры ациламинокислот	74
2.4.1.5. Разделение энантиомеров	79
2.4.1.5.1. Разделение на оптически активных неподвижных фазах	79
2.4.1.5.2. Разделение диастереомеров	81

2.4.2. Газовая хроматография пептидов	82
2.4.2.1. Производные пептидов	83
2.4.2.2. Разделение пептидов	83
2.5. Масс-спектрометрия	84
2.5.1. Хроматомасс-спектрометрия	85
2.5.1.1. Аминокислоты	85
2.5.1.2. Олигопептиды	88
Литература	94
 Глава 3. Белки. <i>Николас Кацмпулас</i>	104
3.1. Введение	104
3.2. Хроматография белков	106
3.2.1. Гель-хроматография	106
3.2.2. Ионообменная хроматография	108
3.2.3. Аффинная хроматография	109
3.2.4. Адсорбционная хроматография	110
3.2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография	111
3.3. Электрофорез белков	111
3.3.1. Общая классификация методов	111
3.3.2. Приборы для аналитического электрофореза	115
3.3.3. Аппаратура для аналитического разделения на носителях различного типа	115
3.3.4. Аппаратура для препаративного разделения в жидких средах	116
3.3.5. Электролитические системы	118
3.3.6. Зонный электрофорез при постоянном значении pH	119
3.3.7. Изоахофорез	120
3.3.8. Многофазный зонный электрофорез (диск-электрофорез)	122
3.3.9. Электрофоретическое удерживание в полиакриламидных гелях	123
3.4. Изоэлектрическое фокусирование	124
Литература	127
 Глава 4. Липиды. <i>Арнис Куксис</i>	130
4.1. Введение	130
4.2. Получение экстрактов липидов	131
4.2.1. Экстракция липидов из тканей	131
4.2.2. Элюирование липидов с адсорбентов	133
4.2.3. Меры предосторожности, необходимые при работе с образцами липидов	134
4.3. Разделение липидов различных классов	135
4.3.1. Разделение полярных и неполярных липидов	135
4.3.1.1. Колоночная хроматография	135
4.3.1.2. Тонкослойная хроматография	136
4.3.2. Выделение неполярных липидов различных классов	137
4.3.2.1. Колоночная хроматография	137
4.3.2.2. Тонкослойная хроматография	140
4.3.3. Выделение фосфолипидов различных классов	147
4.3.3.1. Колоночная хроматография	147
4.3.3.2. Тонкослойная хроматография	151
4.3.4. Выделение гликолипидов различных классов	159
4.3.4.1. Колоночная хроматография	159
4.3.4.2. Тонкослойная хроматография	163
4.4. Разделение смесей липидов на индивидуальные соединения	167
4.4.1. Жирные кислоты	167

4.4.1.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	167
4.4.1.2. Газо-жидкостная хроматография	170
4.4.1.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	174
4.4.2. Окисленные жирные кислоты и простагландины	176
4.4.2.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	176
4.4.2.2. Газо-жидкостная хроматография	178
4.4.2.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	180
4.4.3. Нейтральные ацилглицерины	182
4.4.3.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	183
4.4.3.2. Газо-жидкостная хроматография	185
4.4.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	191
4.4.4. Церамиды	194
4.4.4.1. Адсорбционная хроматография	194
4.4.4.2. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	195
4.4.4.3. Газо-жидкостная хроматография	196
4.4.4.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография	197
4.4.5. Глицерофосфолипиды и сфингомиелины	197
4.4.5.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	198
4.4.5.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография	199
4.4.6. Гликолипиды	201
4.4.6.1. Хроматография на носителях, содержащих ионы серебра	201
4.4.6.2. Газо-жидкостная хроматография	202
4.4.6.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	203
4.5. Определение общего состава липидов	204
4.5.1. Тонкослойная хроматография	204
4.5.2. Газо-жидкостная хроматография	207
4.5.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	208
4.6. Выводы	210
Литература	211

Глава 5. Терпены. Родней Кротью, Роберт К. Рональд 229

5.1. Введение	229
5.2. Гемитерпены, мевалоновая кислота и родственные соединения	230
5.3. Монотерпены	232
5.3.1. Газо-жидкостная хроматография	232
5.3.2. Тонкослойная хроматография	237
5.3.3. Колоночная хроматография	238
5.4. Сесквитерпены	239
5.4.1. Газо-жидкостная хроматография	241
5.4.2. Тонкослойная и колоночная хроматография	242
5.5. Дитерпены	243
5.5.1. Газо-жидкостная хроматография	243
5.5.2. Тонкослойная хроматография	244
5.5.3. Колоночная хроматография	245
5.6. Сестеротерпены	246
5.7. Тритерпены	246
5.7.1. Газо-жидкостная хроматография	246
5.7.2. Тонкослойная хроматография	247
5.7.3. Колоночная хроматография	247
5.8. Тетратерпены	248
5.8.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	248
5.8.2. Тонкослойная хроматография	251
5.8.3. Газо-жидкостная хроматография	253
5.9. Полипrenoлы	254
5.9.1. Газо-жидкостная хроматография	254

5.9.2. Тонкослойная хроматография	254
5.9.3. Колоночная хроматография	255
5.10. Фосфорилированные терпены	256
5.10.1. Бумажная хроматография	256
5.10.2. Тонкослойная хроматография	257
5.10.3. Колоночная хроматография	257
5.11. Гликозилированные терпены	259
5.11.1. Газо-жидкостная хроматография	259
5.11.2. Тонкослойная хроматография	260
5.11.3. Колоночная хроматография	260
5.11.4. Бумажная хроматография и другие методы	261
5.12. Терпеноидные витамины	261
5.12.1. Витамин А	261
5.12.2 Витамин Е	264
5.12.3. Витамин К	267
Литература	270
 Глава 6. Стероиды. Эрих Хефتمان	 286
6.1. Введение	286
6.2. Стерины	287
6.3. Витамины D	293
6.4. Сапогенины и алкалоиды	295
6.5. Производные эстрана	297
6.6. Производные андростана	300
6.7. Производные прегнана	303
6.8. Кортикостероиды	305
6.9. Различные гормоны	307
6.10. Желчные кислоты	310
6.11. Экдистероиды	313
6.12. Лактоны	314
Литература	317
Предметный указатель	327

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

