

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

На правах рукописи

**БАРАМ
Григорий Иосифович**

**РАЗВИТИЕ МЕТОДА МИКРОКОЛОНОЧНОЙ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ РЕШЕНИЯ
КОМПЛЕКСНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ**

02.00.20 - хроматография

**ДИССЕРТАЦИЯ
в виде научного доклада на соискание ученой степени
доктора химических наук**

Иркутск 1997

Официальные оппоненты:

доктор технических наук, профессор В.И.Калмановский

доктор химических наук, профессор Б.В.Мчедlishvili

доктор химических наук С.М.Староверов

Ведущая организация:

Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН

Защита состоится 20 ноября 1997 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 002.95.02 при Институте физической химии РАН по адресу: 117915, Москва ГСП-1, Ленинский проспект, 31.

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института физической химии РАН.

Диссертация в виде научного доклада разослана 20 октября 1997 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Л.Н.Коломиец

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Появившись более 25 лет назад, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в настоящее время стала одним из самых мощных аналитических методов, главным преимуществом которого является, прежде всего, универсальность по отношению к анализируемым веществам. Потенциальные возможности ВЭЖХ создали в аналитической химии реальные предпосылки для широчайшей унификации всего химического анализа путем замены во многих случаях большого числа других методов и их вариантов. Однако, несмотря на такие перспективы, внедрение ВЭЖХ в рутинную практику происходит весьма медленно. Научная литература свидетельствует, что до сих пор во многих лабораториях отдается предпочтение пусть менее совершенным, менее производительным и менее достоверным, но более привычным методам исследования. Изучение сложившейся ситуации дает основание утверждать, что главными причинами, сдерживающими широкое применение ВЭЖХ являются следующие:

- относительно высокая сложность оборудования для ВЭЖХ, рассчитанного на эксплуатацию при давлениях до 30 и более МПа, и прямо связанная с этим его высокая стоимость;
- необходимость использования больших объемов специально очищенных и, следовательно, дорогих растворителей для подвижных фаз.

Выход из создавшегося положения нам видится в удешевлении жидкостных хроматографов за счет отказа от высоких давлений и, тем самым, упрощения их конструкции, а также в уменьшении расхода подвижной фазы на один анализ за счет уменьшения объема хроматографической колонки.

Следует отметить, что по отдельности каждый из этих путей хорошо обоснован, изучен и апробирован. На рынке аналитического оборудования можно найти и микроколоночные хроматографы высокого давления, и хроматографы "среднего" давления для работы с колонками объемом 2-5 мл, но ни те, ни другие большого распространения не получают, т.к. первые - чрезмерно дороги и ненадежны, а вторые - предназначены для решения лишь узких задач (главным образом, для разделения биополимеров). Тем не менее, за 25 лет развития ВЭЖХ в области рутинного анализа прослеживается явная тенденция к переходу к более коротким колонкам. Так, если 10-15 лет назад фактически "стандартной" считалась колонка $\varnothing 4.6 \times 250$ мм, то в последние годы колонки диаметром 2 или длиной 100-150 мм применяются все чаще.

Основным препятствием для интенсивного внедрения ВЭЖХ на коротких колонках малого диаметра является отсутствие пригодных для работы с ними хроматографов. По сравнению с обычными, такие хроматографы должны обеспечивать малые скорости потока и малое внеколоночное уширение

хроматографических зон, имея при этом достаточно высокие метрологические характеристики и оставаясь в рамках типичного для рутинного химического анализа масштаба. Разработка и организация промышленного производства таких приборов представляется нам весьма актуальной задачей. В этом ключе, не менее актуальная и другая задача - разработка типовых методик анализа с применением предлагаемого варианта ВЭЖХ, предназначенных для решения как простых, так и комплексных аналитических задач.

Цель работы состояла в обосновании выбора масштаба микроколоночной ВЭЖХ (МК ВЭЖХ), не выходящего за рамки масштаба рутинного химического анализа, в проектировании макетов и промышленных образцов хроматографического оборудования, в исследовании их метрологических характеристик, в разработке таких методик ВЭЖХ-анализов для различных областей науки и практики, в которых бы преимущества МК ВЭЖХ выявлялись в максимальной степени.

Научная новизна. Разработан метод МК ВЭЖХ, масштаб которого оптимизирован по отношению к типичному масштабу современного химического рутинного анализа. Его основные характеристики следующие:

- колонка $\varnothing 2 \times 60-80$ мм; с сорбентом, размер зерна которого равен 5 мкм, колонка имеет эффективность 5000-6000 теоретических тарелок, что обеспечивает ее пиковую емкость до 30-40 пиков при изократическом элюировании, а при градиентном - до 50 пиков;
- скорость потока элюента - 100-200 мкл/мин;
- рабочее давление - 3-4 МПа;
- расход элюента на один анализ - 2 мл;
- время анализа - 5-30 мин.

По сравнению с обычной ВЭЖХ на колонке $\varnothing 4.6 \times 250$ мм достигнута более, чем 10-ти кратная экономия растворителя; во столько же раз снижены требования к его чистоте.

Показана применимость разработанного метода МК ВЭЖХ для решения широкого круга аналитических задач:

- исследована обращенно-фазная (ОФ) МК ВЭЖХ белков и пептидов; получены данные для прогнозирования результатов разделения по начальным условиям (нагрузка на колонку, крутизна градиента, скорость потока);
- в сочетании с техникой многоволнового УФ-детектирования разработаны методики микропрепаративной ОФ МК ВЭЖХ для структурных исследований белков и пептидов и методики анализа аминокислот;
- методом ОФ МК ВЭЖХ впервые выполнены следующие работы: идентифицирован аффинно модифицируемый пептид в РНКазе; выделены индивидуальные триптические пептиды белка *E* оболочки вируса клещевого

- энцефалита и расшифрована их первичная структура; из гидролизатов миоглобина байкальской нерпы выделены пептиды, по структуре которых найдена полная первичная структура миоглобина; из гипофиза теленка выделен пептидный эндогенный лиганд бензодиазепинового рецептора; разработана методика выделения микроколичеств ДНС-производного пептидов;
- для оценки загрязнения природных вод экотоксикантами впервые разработаны ВЭЖХ-методики определения коэффициентов аккумуляции хлорфенолов в желчи рыбы методики определения DDT (и его метаболитов) и суммы фталатов в жире тюленя; разработана и апробирована *in situ* методика прямого определения бис(2-этилгексил)фталата в воде оз. Байкал;
 - для искусственных смесей и объектов окружающей среды показана применимость ОФ МК ВЭЖХ для определения полициклических ароматических углеводородов, пестицидов, фенолов, нитросоединений, фталатов и неорганических анионов;
 - разработаны методики определения хлорофиллов, альдегидов и УФ-поглощающих веществ, которые в одном пакете с другими методиками анализа делают хроматографы "Милихром" широко применимыми для контроля качества питьевой воды;
 - разработан принцип формирования банка хроматографических и спектральных данных для идентификации пиков при анализе фармацевтических препаратов методом градиентной МК ВЭЖХ в сочетании с многоволновой детекцией.

Практическое значение работы. Разработанный метод МК ВЭЖХ реализован в серийно выпускающихся с 1982 г. хроматографах "Милихром". В настоящее время "Милихром-5" выпускает АО "Научприбор" (г.Орел), а "Милихром А-02" - ЗАО "ЭкоНова" (г.Новосибирск). Все хроматографы включены в Государственный реестр средств измерений. Всего было выпущено около 4000 приборов.

Исследования в области ОФ МК ВЭЖХ белков и пептидов, а также сама методология этих исследований, представляют практический интерес для структурной химии белка.

Разработанные методики ВЭЖХ-анализа экотоксикантов представляют практический интерес для специалистов, занимающихся фундаментальными исследованиями окружающей среды и контролем ее загрязнения, для лабораторий контроля качества питьевой воды. Предложенная методология применения градиентной ОФ МК ВЭЖХ в сочетании с многоволновым детектированием представляет интерес для специалистов, разрабатывающих методики анализа фармацевтических препаратов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метод МК ВЭЖХ, согласованный по своему масштабу с типичным масштабом рутинного химического анализа и отвечающий его основным требованиям.
2. Алгоритм автоматического ВЭЖХ-анализа на микроколонках и схема микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром А-02" с градиентным двухшприцевым насосом, характеристики которого оптимизированы с учетом ограничений, связанных со сжимаемостью жидкости.
3. Результаты исследования зависимости эффективности микроколонки с обращенной фазой при хроматографии пептидов от скорости элюции, от нагрузки и от крутизны градиента концентрации элюента.
4. Методики определения аминокислот в виде ФТК-, ФТГ- и ДНС-производных, методика препаративной очистки трипсина, методика выделения микроколичеств данселированного производного пептида из реакционной смеси.
5. Комплексные методики выделения:
 - аффинно модифицированного триптического пептида рибонуклеазы;
 - триптических пептидов белка *E* вируса клещевого энцефалита;
 - протеолитических пептидов миоглобина байкальского тюленя;
 - пептидного лиганда бензодиазепинового рецептора (из гипофиза).
6. Методики определения ПАУ, фенолов, пестицидов, фталатов, нитро-соединений, формальдегида и ацетальдегида, хлорофиллов, неорганических анионов в искусственных смесях и в объектах окружающей среды.
7. Методики суммарного определения хлорфенолов в желчи рыб, фталатов и пестицидов группы DDT в жире тюленя.
8. Метод формирования банка хроматографических и спектральных данных для идентификации пиков при анализе фармацевтических препаратов.

Апробация работы. Материалы работы докладывались на 2-ом Всесоюзном симпозиуме по жидкостной хроматографии (Черноголовка, 1982), 10-ой Конференции по изопреноидам (Лазне Требон, ЧССР, 1983), 1-ой Всесоюзной конференции "Хроматография в биологии и медицине"(Москва, 1983), 3-ем Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Рига, 1984), 10-ой Международной конференции по масс-спектрометрии (Сванси, Великобритания, 1985), 5-ом Дунайском симпозиуме по хроматографии (Ялта, 1985), 4-ом Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Алма-Ата, 1987), Всесоюзной конференции "Применение хроматографии на предприятиях химического комплекса" (Пермь, 1989), 1-ой и 2-ой Верецагинских международных конференциях (Иркутск, 1989, 1995), Всесоюз-

ной конференции "Применение хроматографии в пищевой, микробиологической и медицинской промышленности (Геленджик, 1990), 5-ом Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Рига, 1990), 2-ом Финско-Российском семинаре "Химия и экология элементоорганических соединений (Яваскила, Финляндия, 1992), Всероссийской конференции по экономическому развитию Сибири (Новосибирск, 1993), Международном симпозиуме "Байкал как природная лаборатория для изучения изменения глобального климата" (Иркутск, 1994), Международной конференции "Атмосферный аэрозоль" (Хельсинки, 1996), Международном конгрессе по аналитической химии (Москва, 1997).

Результаты работы вошли в состав коллективного труда "Создание метода микроколоночной жидкостной хроматографии, разработка и организация производства микроколоночного хроматографа "Милихром" ("Обь-4")", удостоенного Государственной премии СССР в области техники за 1985 г.

Хроматографы серии "Милихром" многократно демонстрировались на крупнейших международных выставках аналитического оборудования. Так, последняя модель - хроматограф "Милихром А-02" - под торговыми названиями "EnviroChrom" и "SyChrom" экспонировался в Иннсбруке ("HPLC'95"), в Мюнхене ("Analytika'96"), в Чикаго ("Pittcon'96"), в Сан-Франциско ("HPLC'96"), в Харькове ("Фармация'96"), в Москве ("Химия'97").

2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Идея применения "микроколонок" в жидкостной хроматографии для повышения чувствительности анализа была реализована еще до "официального" рождения ВЭЖХ. Позже к ней возвращались не один раз и возвращаются до сих пор, но, несмотря на свои очевидные достоинства, широкого распространения МК ВЭЖХ так и не получила. Подробное рассмотрение причин, по которым МК ВЭЖХ столь настойчиво "отторгается" практикой, позволяет, как нам кажется, выявить главную - несовместимость предлагаемых вариантов миниатюризации ВЭЖХ с существующим масштабом рутинного химического анализа и несогласованность их рекордных возможностей с более "приземленными" требованиями, лежащими в основе самой постановки типовых аналитических задач. В погоне за рекордами, как часто бывает, исследователи, перешагнув границу "разумного", не смогли создать оборудование, по сложности и надежности конкурентоспособное с общепринятым, и их достижения оказались пока невостребованными. В науке и технике аналогичных примеров множество. Разрабатывая свой вариант МК ВЭЖХ, мы постарались учесть это обстоятельство и выбору масштаба хроматографии, обоснованного с точки зрения рутинного химического анализа, уделили особое внимание.

2.1. Хроматографы "Милихром"

2.1.1. Выбор масштаба ВЭЖХ

Исторически эта часть работы была выполнена в два этапа. На первом этапе (1978-1982гг.) мы руководствовались во многом интуитивными соображениями, основанными на поиске компромисса между желанием сделать максимально простой, надежный, отвечающий всем требованиям метрологии микроколоночный хроматограф и техническими решениями, которые должны быть реализуемы при его промышленном производстве.

К этому времени в Новосибирском институте органической химии СО АН СССР, благодаря работам Л.С.Сандахчиева, С.В.Кузьмина, М.А.Грачева, В.В.Власова и др., уже в течение 10 лет в области биоорганической химии нуклеиновых кислот широко применялась микроколоночная ионообменная ЖХ с многоволновым детектированием. Разделения проводили на колонках объемом 50-100 мкл с "мягкими" ионообменниками на макетном оборудовании, изготовленном в том же Институте. Наша задача заключалась, по сути, в том, чтобы повысить эффективность существующего варианта МК ЖХ до уровня современной ВЭЖХ, в которой для "жестких" сорбентов с $d_p=5-10$ мкм ВЭТТ (H) достигала величины 2-4 d_p или 10-40 мкм. Несколько раньше эту проблему пытались решить японские исследователи (D.Ishii и др., 1977), но эффективность их колонок из фторопластовых капилляров с $\varnothing_{внутр}=0.5-1$ мм, не превышала 500-700 теоретических тарелок (т.т.) при $H=6-10d_p$.

При выборе длины колонки (L) мы приняли во внимание результаты фундаментальных исследований по ВЭЖХ, опубликованные в середине 70-х гг. (G.Guiochon, M.Martin, I.Halasz, H.Schmidt и др.), из которых следовало, что по многим критериям оптимальной является колонка с $N \approx 5000-6000$ т.т. Ее разделяющая способность (пиковая емкость Z) в зависимости от приемлемого на практике коэффициента разделения соседних пиков $R_{i,i+1}=1-1.5$ составляет 30-50 пиков (см. рис. 1) и это достаточно для разделения весьма сложных смесей. Цитируемые авторы показали, что в случае плохо разделяемых веществ выгоднее не увеличивать N колонки за счет ее удлинения, а оптимизировать состав подвижной фазы.

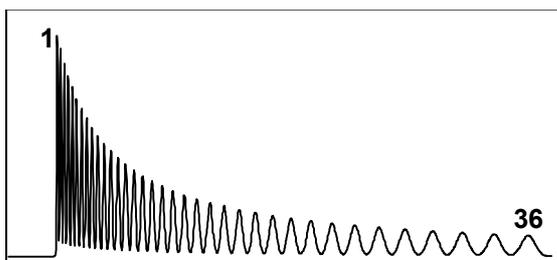


Рис. 1. "Компьютерная" хроматограмма, иллюстрирующая Z колонки с $N=6000$ т.т.

$$k'_1=0; k'_{36}=10; R_{i,i+1}=1.3$$

Ограничив из этих соображений N проектируемой колонки величиной 5000 т.т., мы ориентировались на применение самых мелкодисперсных доступных в

то время сорбентов с $d_p=5$ мкм, позволяющих минимизировать ее длину и, тем самым, время разделения. Так как в ВЭЖХ для этих сорбентов реально достигалась $H=12-15$ мкм, то $L=N \cdot H=60-75$ мм.

Объем колонки ($V_{кол}$) выбирали из необходимости сохранения ее N для малоудерживаемого вещества ($k'=1$) с учетом размывания хроматографической полосы в ячейке детектора. В качестве детектора использовали двухлучевой УФ-микроспектрофотометр (190-360 нм) с Z-образной ячейкой объемом 1.8 мкл ($\varnothing 1.2 \times 1.6$ мм), разработанный и изготовленный в СО АН СССР. Экспериментально найденное значение дисперсии ячейки вместе с входным капилляром ($\sigma_{яч}$) оказалось равным 0.3-0.5 мкл. Принимая, что вклад $\sigma_{яч}$ в дисперсию хроматографического пика ($\sigma_{пик}$) не должен превышать 10% (для пика вещества с $k'=1$ $\sigma_{пик} \geq 4$ мкл), а объем пор типичного для ВЭЖХ силикагелевого сорбента составляет $\approx 0.75 V_{кол}$, для колонки с $N=5000$ т.т. вычисляли ее минимальный объем $V_{кол}$ из уравнения:

$$V_{кол} = \frac{V_0}{0.75} = \frac{\sigma_{пик} \cdot \sqrt{N}}{0.75 \cdot (1+k')} \approx 200 \text{ мкл}, \quad (1)$$

где V_0 - свободный объем колонки.

Так как колонки экономически выгоднее делать из стандартных коммерчески доступных трубок, диаметры которых изменяются дискретно, то для колонки с $V_{кол}=200$ мкл и $L=60-75$ мм ближе всего размеры " $\varnothing 2 \times 62$ мм", взятые нами в качестве базовых. По сравнению со "стандартной" ВЭЖХ-колонкой, объем нашей был меньше примерно в 20 раз, и это дало основание назвать ее "микроколонкой". Очевидно, что подобный термин носит весьма условный характер, впрочем, как и сам термин "ВЭЖХ".

После экспериментальных проверок нескольких вариантов конструкции микроколонки, узла ввода пробы и методик упаковки колонок "жесткими" прямыми и обращенными фазами с $d_p=5$ мкм, нам удалось достичь проектной эффективности 5000 т.т. Такой результат был получен во многом благодаря неоценимым советам А.Карапетяна.

Итогом этого этапа работы явился хроматограф "Обь-4", около 30 которых было выпущено Опытным заводом СО АН СССР (г.Новосибирск) в 1980-1982 гг. Под названием "Милихром-1" этот хроматограф серийно производился в 1982-1987 гг. в ПО "Научприбор" (г.Орел). Затем его заменили более автоматизированные модели "2", "4" и "5" (см. рис. 2).

Для всех этих приборов масштаб хроматографии был одинаковым:

- колонка $\varnothing 2 \times 60-80$ мм с реализованной эффективностью $N=4000-5000$ т.т.;
- типичная скорость потока элюента $F=0.1-0.2$ мл/мин;
- типичное рабочее давление $P=2-4$ МПа;
- типичный расход элюента на один анализ - 2 мл.

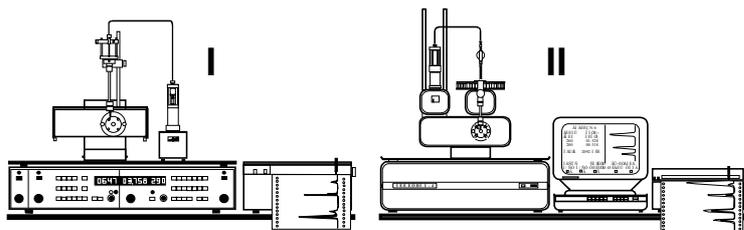


Рис. 2. Хроматографы серии "Милихром".

I. "Обь-4" и "Милихром-1".

II. "Милихромы 2; 4 и 5".

По сравнению с общепринятым масштабом ВЭЖХ, характерным для колонки $\varnothing 4.6 \times 250$ мм, за счет применения более короткой и узкой колонки экономия подвижной фазы составила более 10 раз, а рабочее давление уменьшилось в 3-4 раза. Многолетняя эксплуатация хроматографов "Милихром" во многих аналитических лабораториях доказала принципиальную пригодность этого варианта МК ВЭЖХ для решения самых разнообразных задач.

В начале 90-х годов, когда возникла необходимость в разработке более совершенного хроматографа, мы вернулись к проблеме выбора масштаба. С одной стороны, новые технологические возможности позволяли уменьшить $V_{кол}$ еще в 5-10 раз и получить большую экономию элюента. С другой стороны, нельзя было не учесть отрицательный опыт внедрения ВЭЖХ на "сверхминиатюрных" колонках в практику. Исходя из этого, в основу проекта мы положили не наши возможности, а сложившиеся к этому времени общие требования, предъявляемые к рутинному ВЭЖХ-анализу. Информация, полученная путем просмотра 200 работ прикладного характера за 1985-86 гг. в журналах "*Chromatographia*" и "*Analyt. Biochem.*", свелась к следующему:

- количество веществ, определяемых в одном анализе, составляет от 1 до 20;
- концентрация аналита в инжестируемом образце составляет 10^{-5} - 10^{-2} М;
- полный объем образца, подготовленного для ВЭЖХ-анализа, превышает 100-200 мкл; при работе с меньшими объемами заметно возрастает погрешность анализа из-за ошибок, вносимых лабораторным оборудованием;
- минимальный объем образца, вводимый в колонку, также ограничен возможностями лабораторного оборудования и равен не менее 10-20 мкл;
- минимальное количество определяемого вещества равно $\approx 10^{-10}$ моля;
- погрешность всего анализа (включая пробоподготовку) - $>5\%$, что при определении 10^{-10} моля вещества соответствует пределу чувствительности ВЭЖХ-стадии всего анализа $\approx 10^{-12}$ моля;
- продолжительность хроматографического анализа составляет 10-30 мин.

Следует отметить, что перечисленные выше основные характеристики ВЭЖХ-анализа хорошо согласуются с общим уровнем *типичного* рутинного химического анализа, определяемым следующими причинами:

- метрологические характеристики *типичного* лабораторного оборудования (весы, пипетки, шприцы, мерные пробирки, колбы и цилиндры) не позволяют получить погрешность анализа лучше 5%;

- при работе с объемами <0.1 мл заметный вклад в погрешность анализа вносит испарение растворов;
- при концентрации аналита в растворе $<10^{-5}$ М погрешность анализа увеличивается из-за его потерь в результате адсорбции на стенках посуды и взаимодействия с атмосферой и микропримесями;
- сама постановка аналитической задачи, обусловленная целесообразностью, экономическими соображениями и нормативной базой, в большинстве случаях не требует погрешности анализа лучше 5-10%.

Статистическая выкладка, сделанная по материалам этих же статей, а также из обзора R.E.Majors (*LC-GC*, 1992, v.5, No.2 p.12-20), показала, что в рутинной практике чаще всего применяется "стандартный" вариант ВЭЖХ:

- разделение на обращенных фазах ($>60\%$) с $d_p=5-7$ мкм ($>50\%$);
- длина колонки составляет 150-250 мм ($\approx 50\%$), а ее диаметр - 4-5 мм ($\approx 70\%$);
- вычисленная из приведенных в статьях хроматограмм эффективность колонок составила 1000-3000 (34%) и 3000-6000 (42%) теоретических тарелок.

Полученная таким образом совокупность исходных данных позволила получить представление о реальном состоянии рутинной ВЭЖХ. Обращает на себя внимание тот факт, что длина применяемых в большинстве случаях колонок явно завышена. Эффективность колонок с $L=150-250$ мм с сорбентом, имеющим $d_p=5$ мкм, должна составлять не менее 12000-20000 т.т., но на практике она существенно ниже (1000-6000 т.т.). Причина такого несоответствия объясняется либо несовершенством методик разделения (например, неправильно выбран состав подвижной фазы), либо большим экстраколоночным размыванием хроматографической полосы из-за несогласованности колонки с применяемым хроматографическим оборудованием.

Поскольку выбранный нами ранее вариант МК ВЭЖХ гарантировано обеспечивал *достаточную* для рутинных анализов $N_{кол}=5000$ т.т., при проектировании нового хроматографа мы не стали изменять ее L . Длину колонки можно было бы уменьшить, перейдя к сорбентам с $d_p=3$ мкм, но такие фазы менее доступны, дороже, их ассортимент довольно ограничен, а колонки часто имеют меньший срок службы.

Мы не стали уменьшать $V_{кол}$ за счет уменьшения ее диаметра. Разумеется, это пропорционально уменьшило бы расход элюента на один анализ, но, по сравнению с уже достигнутым уровнем экономии, дальнейшее его снижение незначительно. Уменьшение $V_{кол}$, кроме того, привело бы к ограничению ее препаративных возможностей, которые, важны, например, при работе с пептидами и белками. Наконец, уменьшение $V_{кол}$ было бы не оправдано с точки зрения нижней границы существующего масштаба рутинного анализа - необходимость работы с объемами <1 мкл увеличила бы погрешность анализа, а

также уменьшился бы коэффициент использования образца, подготовленного для разделения.

Практически полное совпадение масштабов рутинной МК ВЭЖХ, по разным соображениям выбранных на первом и втором этапах работы, дополнительно дало уверенность в правильности нашего подхода.

В заключение этого раздела отметим еще раз, что в современной ВЭЖХ явно видны тенденции к уменьшению либо длины колонки, либо ее диаметра (относительно "стандартной" колонки $\varnothing 4.6 \times 250$ мм). Наш подход отличается тем, что мы уменьшили их *одновременно*. О том, какие это дает преимущества, говорят "теоретические" хроматограммы на рис. 3. Из них следует, что при постоянной линейной скорости элюирования переход от "стандартной" колонки к колонке $\varnothing 2 \times 75$ мм сопровождается уменьшением рабочего давления в 3 раза, уменьшением расхода элюента в 18 раз, увеличением чувствительности анализа в 10 раз и его ускорением в 3 раза. Качество разделения при этом, конечно, ухудшается, но не столь заметно.

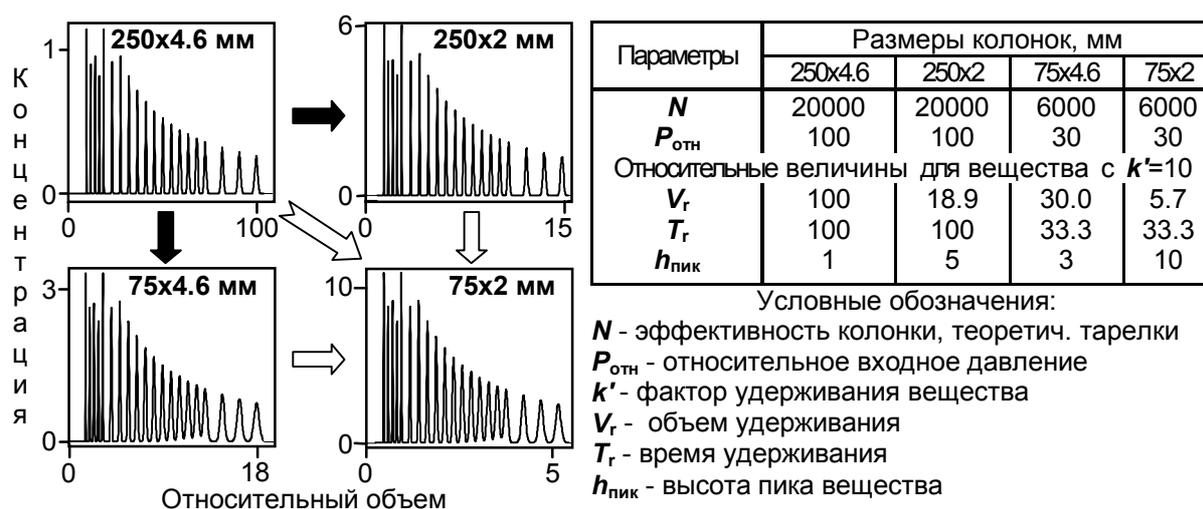


Рис. 3. Компьютерные хроматограммы, иллюстрирующие разделение одной и той же смеси из 20 веществ на различных колонках.

Высоты пиков выражены относительно пиков на хроматограмме "250x4.6 мм". Последний пик соответствует веществу с $k'=10$. Линейная скорость потока для всех разделений одинаковая.

2.1.2. Устройство колонок и инжекторов

Все колонки хроматографов "Милихром" изготавливаются из нержавеющей стали 12X18Н10Т, герметизируются с помощью конических уплотнений типа Swagelok™ (рис. 4) и выдерживают давление до 50 МПа. Сорбент в колонках удерживается фильтрами из пористой нержавеющей стали толщиной 0.1 мм и порами 2-3 мкм. Колонки хроматографов "Милихром 1÷5" можно термостатировать, прокачивая через рубашку воду от внешнего термостата.

Колонка хроматографа "Милихром А-02" (рис. 4-II) термостатируется с помощью электрического нагревателя и трубка 9 улучшает теплообмен.

Для минимизации размывания образца при его введении в колонку во всех хроматографах "Милихром" мы использовали так называемый "капиллярный" способ инъекции. Его суть заключается в том, что раствор образца заданного объема всасывается в капилляр-иглу, которая затем герметично соединяется с колонкой и образец вводится в нее потоком элюента. Такой метод инъекции с остановкой потока стал возможен благодаря тому, что в хроматографах "Милихром" применяются прецизионные насосы шприцевого типа, способные осуществлять не только элюирование, но и дозирование образца с высокой точностью. Заметим, что в "классической" ВЭЖХ остановка потока элюента для ввода образца по многим причинам считается недопустимой, но наши результаты это мнение опровергают.

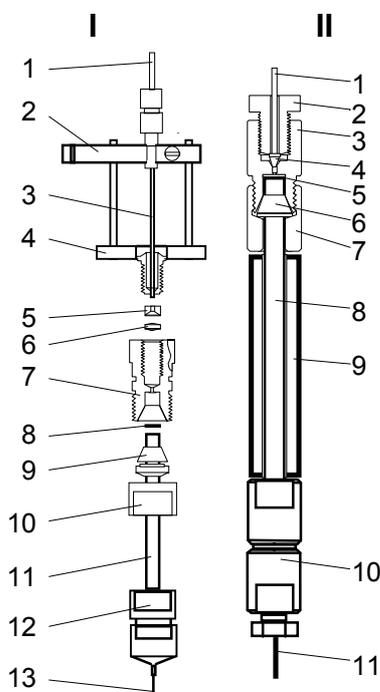


Рис. 4. Колонки хроматографов "Милихром".

I. Колонка хроматографа "Милихром-1".

1- капилляр от насоса; 2- планка для фиксации иглы; 3- инъекционная игла; 4- зажимной винт; 5- шайба; 6- уплотняющее кольцо (фторопласт); 7- корпус инжектора с приемным конусом; 8- верхний фильтр ($\varnothing=3$ мм); 9- конус на трубке колонки; 10- гайка; 11- трубка-колонка ($\varnothing_{\text{внеш}}=3$ мм; $\varnothing_{\text{внут}}=2$ мм; $L=62-80$ мм); 12- нижнее уплотнение в сборе; 13- выходной капилляр (игла).

II. Колонка хроматографа "Милихром А-02".

1- входной капилляр (сталь, $\varnothing_{\text{внеш}}=1.6$ мм); 2- винт; 3- входное гнездо с приемным конусом; 4- конус для присоединения капилляра; 5- входной фильтр ($\varnothing=4$ мм); 6- конус для присоединения трубки; 7- гайка; 8- трубка-колонка ($\varnothing_{\text{внеш}}=4$ мм; $\varnothing_{\text{внут}}=2$ мм; $L=75$ мм); 9- трубка-теплообменник (алюминий); 10- выходная часть колонки в сборе; 11- выходной капилляр (фторопласт, $\varnothing_{\text{внеш}}=1.6$ мм).

Конструкция колонки полностью симметрична.

Чтобы максимально реализовать возможности капиллярного инжектирования, нами была разработана конструкция колонки (рис. 4-I), верхняя часть которой являлась корпусом инжектора и образец из иглы поступал непосредственно на фильтр колонки. В "Милихроме-1" герметизация иглы 3 в инжекторе 7 проводится вручную поворотом винта 4, сжимающего кольцо 6 через шайбу 5. В "Милихромах 2, 4 и 5", снабженных автоматическими дозаторами, уплотняющее кольцо сжато постоянно, игла проходит его с определенным усилием, преодолевая трение, а герметичность соединения достигается за счет упругости фторопласта, из которого изготовлено кольцо.

В хроматографе "Милихром А-02" применено другое техническое решение - специальное пружинное устройство, приводимое в действие электромотором

автодозатора, сжимает уплотняющее кольцо после ввода иглы и снимает с него нагрузку перед выводом иглы. В отличие от колонок хроматографов "Милихромов 1÷5", в "Милихроме А-02" колонка симметрична и соединяется с инжектором коротким капилляром. Это несколько увеличивает экстраколочное размывание зоны образца ($\sigma_{инжек}$), но снимает необходимость изготавливать каждую колонку со своим инжектором. Для компенсации возросшей величины $\sigma_{инжек}$ длина колонки "Милихрома А-02" увеличена до 75 мм.

Оценку влияния $\sigma_{экстра}$ на эффективность разделения ($N_{хром}$), наблюдаемую на хроматограмме для колонки с эффективностью $N_{кол}$, проводили экспериментально. Известно, что $N_{хром} < N_{кол}$ и зависит от (k') и $\sigma_{экстра}$:

$$N_{хром} = N_{кол} \cdot \left[\frac{V_0 (1 + k')^2}{[V_0 (1 + k')^2 + N_{кол} \cdot \sigma_{экстра}^2]} \right] \quad (2)$$

Сравнение кривых **Ib** и **IIa** на рис. 5 говорит о том, что суммарная $\sigma_{экстра}$ для хроматографа "Милихром А-02" составляет около 3 мкл. Эта величина вполне приемлема для "проектных" колонок с $N_{кол} \approx 5000$ т.т. и $V_0 \approx 200$ мкл, но ограничивает применение более эффективных колонок или колонок с меньшим свободным объемом.

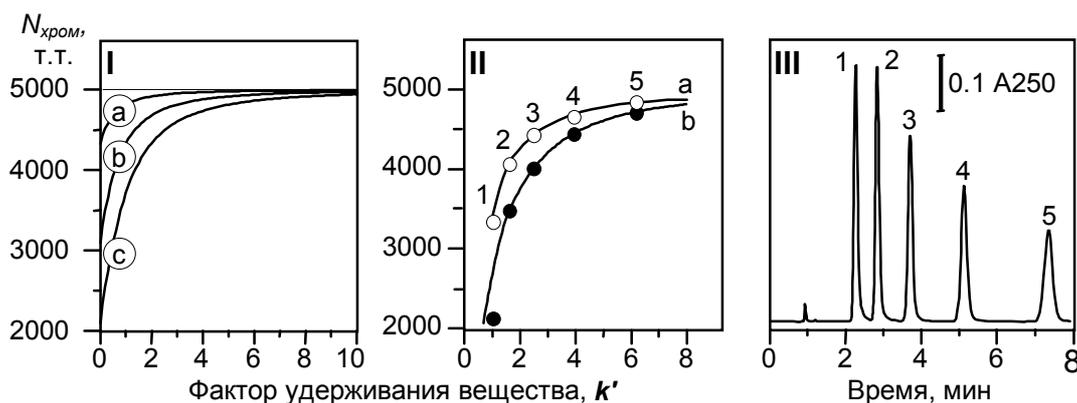


Рис. 5. Эффективность хроматографа "Милихром А-02" ($N_{хром}$) и внеколоночное размывание ($\sigma_{экстра}$).

I. Найденные по уравнению (2) зависимости $N_{хром}$, соответствующие колонке с $N_{кол}=5000$ т.т. и $V_0=180$ мкл для трех величин $\sigma_{экстра}$: 1(a), 2(b) и 3(с) мкл. II. Вычисленные из хроматограммы на рис. III значения $N_{хром}$ для всех веществ смеси; колонку соединяли с инжектором и детектором капиллярами с $L=50$ мм и $\sigma_{внут}=0.15$ мм (a) и 0.3 мм (b). III. Разделение эфиров бензойной кислоты: 1- метилбензоат; 2- этилбензоат, 3- пропилбензоат, 4- бутилбензоат, 5- пентилбензоат. Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм, Nucleosil 100-5 C18 ($V_0=180$ мкл). Элюент: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (70:30). $F=0.15$ мл/мин. $P=4.2$ МПа. $T=45^\circ\text{C}$. Образец: 2 мкл раствора веществ (по 0.5 мг/мл) в CH_3OH .

2.1.3. Насосы

Все хроматографы "Милихром" снабжены прецизионными насосами шприцевого типа, поршень которых приводится в движение шаговым электромотором. Выбор этого типа насосов для нашего варианта МК ВЭЖХ

обусловлен характерным для него принципиально малым уровнем пульсации потока при малых и средних давлениях без применения специальных демпферов, а также возможностью их использования не только для подачи элюента в колонку, но и для инжектирования образца. Все насосы имеют шприцы объемом 2.5 мл и обеспечивают скорость элюирования от 1-5 до 600-1000 мкл/мин (в зависимости от модели хроматографа). Одному шагу мотора соответствует вытесняемый поршнем объем, равный 0.05 мкл. Цилиндры шприцев в насосах хроматографов "Милихром 1÷5" изготовлены из упрочненного стекла и рассчитаны на $P_{\text{макс}}=5$ МПа. Цилиндры насосов хроматографа "Милихром А-02" изготовлены из стали 12Х18Н10Т и обладают большой долговечностью при $P_{\text{макс}}=7$ МПа. Скользящее уплотнение между поршнем и цилиндром достигается с помощью кольца из фторопласта-4, постоянно распираемого пружиной.

Хроматографы "Милихром 1÷5" имеют по одному насосу, но позволяют проводить как изократическую, так и градиентную элюцию. Для градиентной элюции с помощью одного насоса применяется известный способ, заключающийся в использовании преформированного градиента концентрации. В нашей модификации этого метода градиент формируется в шприце насоса последовательным набором порций растворов с убывающей концентрацией "сильного" компонента элюента. Так как растворы отличаются по плотности, то в вертикально расположенном шприце, когда тяжелый раствор находится внизу, смешивание их происходит очень медленно из-за малой скорости диффузии молекул в жидкости. Некоторое отклонение формы градиента от заданной (например, линейной) в практической хроматографии не имеет большого значения - важнее его воспроизводимость (см. рис. 6). Формирование градиента в "Милихроме-1" производится полуавтоматически с помощью наборного поля управления насосом.

В "Милихромах 2, 4 и 5" градиент преформируется в шприце с помощью автоматического дозатора.

Хроматограф "Милихром А-02" имеет в своем составе два насоса (А и В), каждый из которых подает свой раствор. Формирование градиента осуществляется по задаваемой на компьютере программе (таблице) в виде последовательности до 20 отрезков линейных функций изменения концентрации компонента В. Смешивание растворов А и В производится в смесителе пассивного типа, представляющего собой изогнутый "змейкой" отрезок стального капилляра с $\varnothing_{\text{внут}}=0.5$ мм и $V=40$ мкл. Об эффективности этого градиентного устройства можно судить из рис. 7.

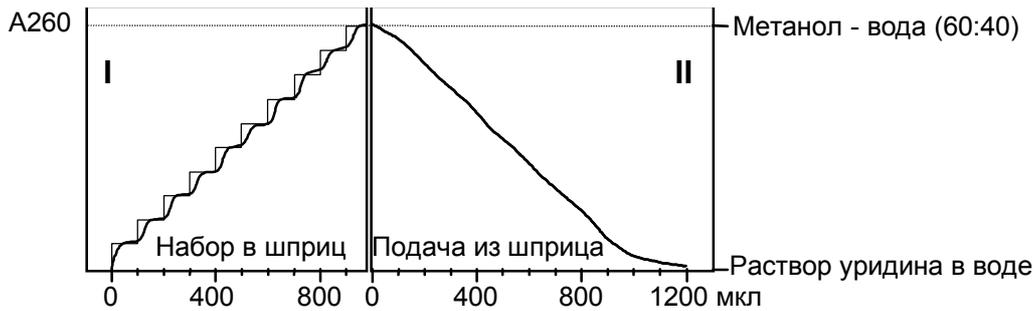


Рис. 6. Формирование градиента концентрации элюента в шприце насоса хроматографа "Милихром-1".

I. Последовательный набор в шприц насоса порций по 100 мкл светопоглощающего раствора через кювету. Концентрация раствора от порции к порции увеличивается.

II. Кривая, полученная при прокачивании сформированного градиента через ячейку детектора (приведены результаты двух опытов - кривые полностью совпадают). Для получения градиента концентрации использовали смеси двух растворов - водный раствор уридина и 60% водный раствор метанола в пропорциях (9:1), (8:2), ..., (1:9), (0:10). Скорость потока: 200 мкл/мин. Проверка градиентов (II) проводилась через 5 мин после набора (I).

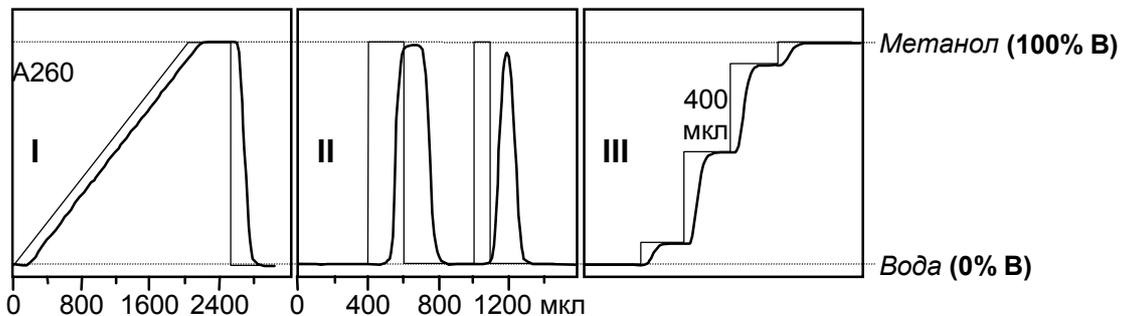


Рис. 7. Градиенты концентраций метанола (B) в воде (A), полученные на хроматографе "Милихром А-02".

I. Два наложенных друг на друга линейных градиента от 0 до 100% B с возвратом к 0% B.

II. Измерение эффективности градиентного насоса по искажению прямоугольных импульсов концентрации метанола шириной 100 и 200 мкл. Для импульса с шириной 100 мкл $\sigma \approx 50$ мкл.

III. Ступенчатый градиент концентрации метанола с шириной ступеней по 400 мкл.

Задаваемая форма градиентов показана тонкой линией. Все градиенты регистрировались по поглощению добавленного в метанол уридина (0.5 мМ раствор), для чего растворы из инъекционной иглы подавались непосредственно в измерительную ячейку. Скорость потока во всех экспериментах составляла 200 мкл/мин.

При проектировании хроматографа "Милихром А-02", включающего в себя не один, а два насоса, особое внимание мы уделили проблеме, связанной со сжимаемостью жидкости и характерной для элюирования с помощью шприцевых насосов. Она состоит в том, что после ввода образца в колонку при нулевом давлении, объемная скорость потока подвижной фазы достигает своего заданного значения F постепенно и достигнет его только тогда, когда давление на входе в колонку (P) станет практически постоянным. Строго говоря, постоянной величины оно достигнет через время $t = \infty$, приближаясь к соответствующей величине P_{∞} асимптотически, так как одновременно со сжатием элюент вытекает из колонки.

"Эффект сжатия" определяется объемом сжимаемой жидкости (V_p), ее коэффициентом сжимаемости (χ), температурой, зернением адсорбента, скоростью потока и вязкостью элюента. В первом приближении, разделение при переменной F можно считать вполне допустимым, так как ЖХ - метод анализа, в котором измерения проводятся относительно внешнего или внутреннего стандарта, чьи пики будут иметь те же самые искажения. Однако, по многим причинам добиться высокой воспроизводимости такого режима хроматографирования нам представляется задачей весьма сложной. Мы приняли компромиссное решение: так как величины $(V_p)_{\max} \approx 5.5$ мл и $V_0 \approx 0.18$ мл уже были определены на предыдущих этапах проектирования хроматографа, то следовало ограничить величину $(P_\infty)_{\max}$ так, чтобы для большинства подвижных фаз скорость потока элюента достигала значения $0.99F$ раньше, чем начнет элюироваться неударживаемый компонент образца. В этом случае вклад погрешности, обусловленной переменной скоростью потока, в общую погрешность определения площадей пиков составит $<1\%$.

Проблема применения шприцевых насосов в ВЭЖХ была рассмотрена в статье (M.Martin с сотр., 1975), материалы которой мы использовали для своих вычислений.

При скорости вытеснения элюента из шприца насоса, равной $F_{\text{шпр}}$, зависимость величины текущего давления P , стремящегося к заданному давлению P_∞ , от времени t описывается уравнением:

$$P \approx P_\infty \cdot \left[1 - \left(1 - \frac{F_{\text{шпр}} \cdot t}{V_p} \right)^{\frac{1}{\chi \cdot P_\infty}} \right] \quad (3)$$

где V_p - полный объем сжимаемого элюента, χ - его коэффициент сжимаемости, а $\Delta V_{\text{шпр}} \ll V_p$. Графически эта зависимость показана на рис. 8, из которого следует, что при $F_{\text{шпр}} = 200$ мкл/мин и $P_\infty = 7$ МПа скорость потока метанола становится практически постоянной через ≈ 1 мин после включения насоса или после вытеснения из шприца первых 200 мкл. Поскольку этот объем близок по величине к свободному объему колонки V_0 , то $P = 7$ МПа следует считать предельно допустимым давлением, если мы хотим элюировать вещества из колонки при $F = \text{const}$.

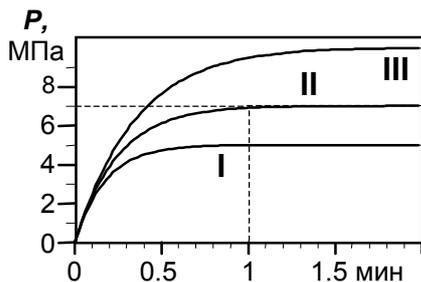


Рис. 8. Зависимости текущего давления P от времени с момента начала элюции, соответствующие уравнению (3).

I. $P_\infty = 5$ МПа. II. $P_\infty = 7$ МПа. III. $P_\infty = 10$ МПа.

$V_p = 5.5$ мл. $F_{\text{шпр}} = 0.2$ мл/мин.
 $\chi = 1.25 \text{ кПа}^{-1}$ (метанол, 25°C).

Объем элюата ($V_{0.99}$), вытекшего из колонки к моменту, когда скорость потока через колонку составит $0.99F$ (при $P=0.99P_{\infty}$) находили по уравнению:

$$V_{0.99} \approx V_p (e^{-\chi \cdot P_{\infty}} - 0.01^{\chi \cdot P_{\infty}}) \quad (4)$$

Зависимости $V_{0.99}=f(P_{\infty})$ для 4-х растворителей приведены на рис. 9. Из них следует, что для начальных условий [$(V_p)_{\max} \approx 5500$ мкл; $V_r > (V_0 \approx 180)$ мкл] значение $(P_{\infty})_{\max}$ необходимо ограничить на уровне ≤ 7 МПа. В противном случае малоудерживаемые вещества в смешанных (более вязких) подвижных фазах будут элюироваться из колонки при скорости потока $< 0.99F$.

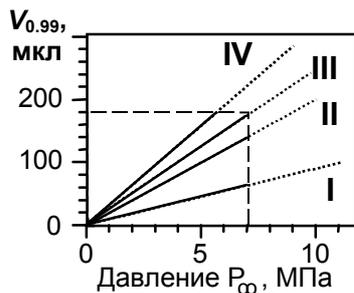


Рис. 9. Зависимости объемов элюатов, вытекших из колонки хроматографа "Милихром А-02" к моменту установления скорости потока, равной $0.99F$.

I. Вода ($\chi=0.46 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$). II. Ацетонитрил ($\chi=0.98 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$). III. Метанол ($\chi=1.25 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$). IV. Гексан ($\chi=1.61 \cdot 10^{-3} \cdot \text{МПа}^{-1}$).

Вычисления сделаны по уравнению (4) для $V_p=5500$ мкл.

В нашем варианте ВЭЖХ определяемые из хроматограмм объемы удерживания веществ $(V_r)_{\text{хром}}$ из-за сжимаемости элюента будут всегда больше истинных величин V_r , которые можно найти из уравнения

$$V_r = (V_r)_{\text{хром}} - \Delta V = (V_r)_{\text{хром}} - \chi \cdot V_p \cdot P_{\infty} - \Delta V_{\text{суст}} \approx (V_r)_{\text{хром}} - \chi \cdot V_p \cdot P_{\infty} \quad (5)$$

где $\Delta V_{\text{суст}}$ - вклад в V_r , обусловленный упругостью элементов гидравлической схемы хроматографа. Его величина по экспериментальным оценкам для хроматографа "Милихром А-02" при $P=7$ МПа не превышает 2-3 мкл. Об этом дополнительно свидетельствует хорошее совпадение экспериментально найденных точек с прямыми $\Delta V = \chi \cdot V_p \cdot P_{\infty}$ для всех 3-х растворителей на рис. 10.

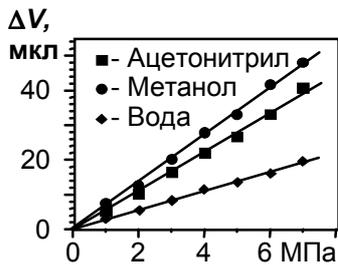


Рис. 10. Экспериментально полученные значения поправок на сжимаемость (ΔV) для некоторых растворителей в зависимости от давления P_{∞} , развиваемого насосами "Милихрома А-02".

$V_p=5.5$ мл. $T=22^{\circ}\text{C}$.

2.1.4. Хроматограф "Милихром А-02"

"Милихром А-02" (рис 11) является последним и наиболее совершенным в серии "Милихром" хроматографом. Его разработка была выполнена по заказу фирмы "KNAUER GmbH" (Берлин) ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск) совместно с Институтом ядерной физики СО РАН, Лимнологическим институтом СО РАН и Новосибирским институтом биорганической химии СО РАН. В 1996 г.

хроматограф был аттестован Госстандартом РФ, внесен в Государственный реестр средств измерений (№ 15117-96) и начал серийно производиться в ЗАО "ЭкоНова" совместно с Бердским электромеханическим заводом. Торговое название хроматографа для стран западной Европы - "EnviroChrom". Оно отражает возможность использования хроматографа для анализа объектов *окружающей среды* (*Environment* - англ.) в условиях мобильных или полевых лабораторий. Это во многом определило такие его качества, как рекордно малые размеры, вес и потребление электроэнергии, прочность корпуса, моноблочность конструкции. Главное же, благодаря чему "Милихром А-02" получил статус "полевого" хроматографа - это принципы МК ВЭЖХ, характерные для всех хроматографов "Милихром". Обычные жидкостные хроматографы из-за большого расхода растворителей в полевую или мобильную лабораторию "вписываются" с большим трудом.

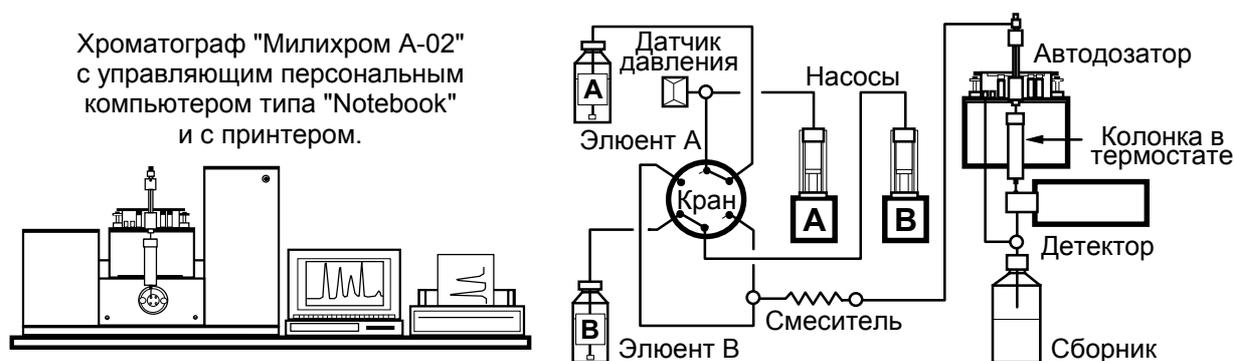


Рис. 11. Хроматограф "Милихром А-02", схема его устройства и его технические характеристики.

Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм; свободный объем > 150 мкл.

Детектор: двухлучевой многоволновой автоматический УФ-фотометр (190-360 нм).

До 8 длин волн в цикле при многоволновом детектировании.

Шаг изменения λ при многоволновом детектировании и при регистрации спектра: 2 нм.

Спектральная ширина щели: 5 нм.

Погрешность установки λ : ± 0.5 нм.

Воспроизводимость установки λ : ± 0.005 нм.

Постоянная времени и время измерения поглощения при одной λ в цикле: 0.03-10 сек.

Диапазоны измерения поглощения: от -20 до $+20$ о.е.

Отклонение от линейности не более 1% в диапазоне от -10 до $+10$ о.е.

Уровень шума при $\lambda = 260$ нм и постоянной времени 0.3 сек: < 0.0002 о.е.

Дрейф нулевой линии: < 0.0001 о.е./час.

Измерительная ячейка Z-типа: длина 1.56 мм; диаметр 1.0 мм; объем 1.26 мкл.

Насос: двухшприцевый; дозирующий; объем шприцев по 2500 мкл.

Скорость потока: 5-999 мкл/мин.

Абсолютная погрешность скорости потока: 1%.

Предельное давление: 7 МПа.

Время полного заполнения шприца: 1.7 мин.

Градиентное элюирование: кусочно-линейные градиенты (до 20 ступеней).

Автодозатор: программируемый на 46 образцов до 200 анализов.

Объем пробирки для образца: 200 мкл.

Инъектируемый объем: 1-99 мкл при шаге 1 мкл.

Относительная погрешность дозирования объема 2 мкл: 2%.

Термостат колонки: твердотельного типа с электронагревателем.

Диапазон устанавливаемых температур: 35-90°C с шагом 1°C.

Погрешность термостатирования: $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Коррозийная устойчивость: сталь 12X18H10T; сапфир; фторопласты, PEEK, Vespel™.

Размеры и вес (без компьютера): 530x200x300 мм; 17 кг.

Электропитание (без компьютера): 110-120/200-240 В (50/60 Гц); 100 Вт.

"Милихром А-02" целиком управляется с помощью компьютера. Подготовка его к работе включает в себя несколько фиксированных ("ручных") операций, показанных на рис. 12.

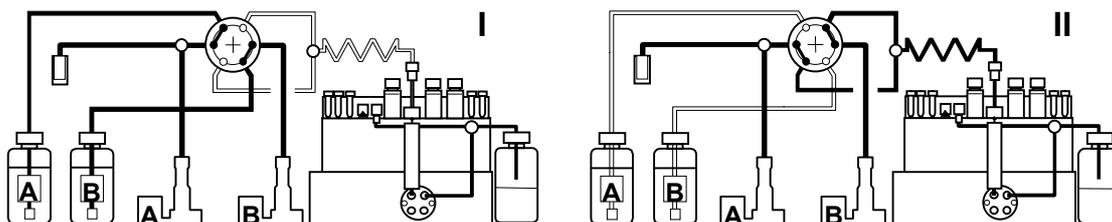


Рис. 12. "Ручные" операции, выполняемые в зависимости от положения крана.

I. Положение крана "насосы↔резервуары". Выполняемые операции: набор элюентов в шприцы; слив элюентов в резервуары; смена элюентов.

II. Положение крана "насосы↔смеситель". Выполняемые операции: слив растворов из насосов в приемник; промывка инжектора; промывка иглы инжектора; проверка герметичности системы.

Все устанавливаемые параметры анализа записываются в файл. Последовательность операций, автоматически выполняемых во время анализа, показана на рис. 13.

Для каждого анализа серии, все задаваемые кроме температуры колонки параметры - объемы образца и предобразца, постоянная времени и длины волн детектора, скорость потока, форма градиента - могут иметь свои значения. Результаты автоматически записываются в файл, выводятся на монитор и принтер. Обработка результатов выполняется с помощью сопряженной программы "МультиХром" (ЗАО "Амперсенд", Москва). Все программное обеспечение работает в среде Windows™ (версия 3.1 или выше).

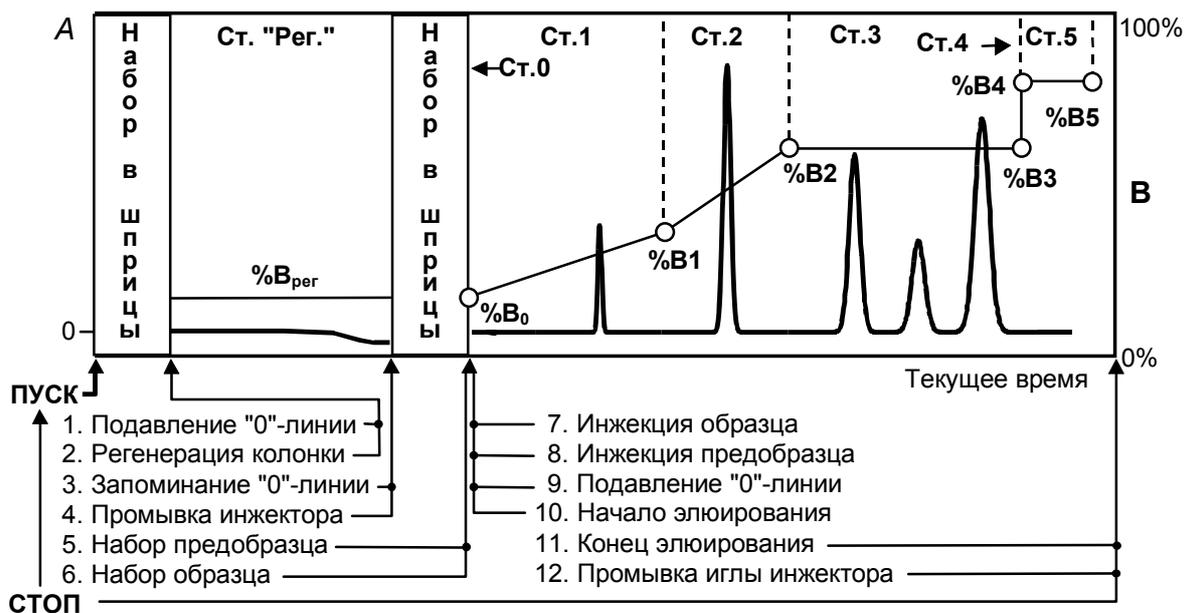


Рис. 13. Последовательность автоматически выполняемых операций во время проведения анализа на хроматографе "Милихром А-02".

2.2. Обращенно-фазная МК ВЭЖХ в структурной химии белка

Разделение пептидов на обращенных фазах (ОФ) является важнейшим методом биоорганической химии белка, широко применяемым в структурных исследованиях. Нами выполнено систематическое изучение возможностей ОФ МК ВЭЖХ в этой области с целью оптимизации метода для решения наиболее характерных задач. На основании этих исследований были разработаны аналитические и микропрепаративные процедуры, позволившие локализовать аффинно модифицированный пептид в молекуле РНКазы, установить первичную структуру миоглобина байкальской нерпы и некоторых триптических пептидов белка оболочки *E* вируса клещевого энцефалита, выделить из гипофиза телят пептид - эндогенный лиганд бензодиазепинового рецептора, разработать новый подход к секвенированию пептидов в сочетании с масс-спектроскопией.

2.2.1. Исследование общих закономерностей ОФ МК ВЭЖХ пептидов

Модельными объектами выбрали пептиды брадикинин ($M=1059$) и инсулин ($M=6300$), а для сравнения - аминокислоту фенилаланин. Были изучены зависимости пиковой емкости колонки $\varnothing 2 \times 64$ мм с Nucleosil 100-5 C18 от скорости потока, нагрузки на колонку и крутизны градиента CH_3CN (рис. 14).

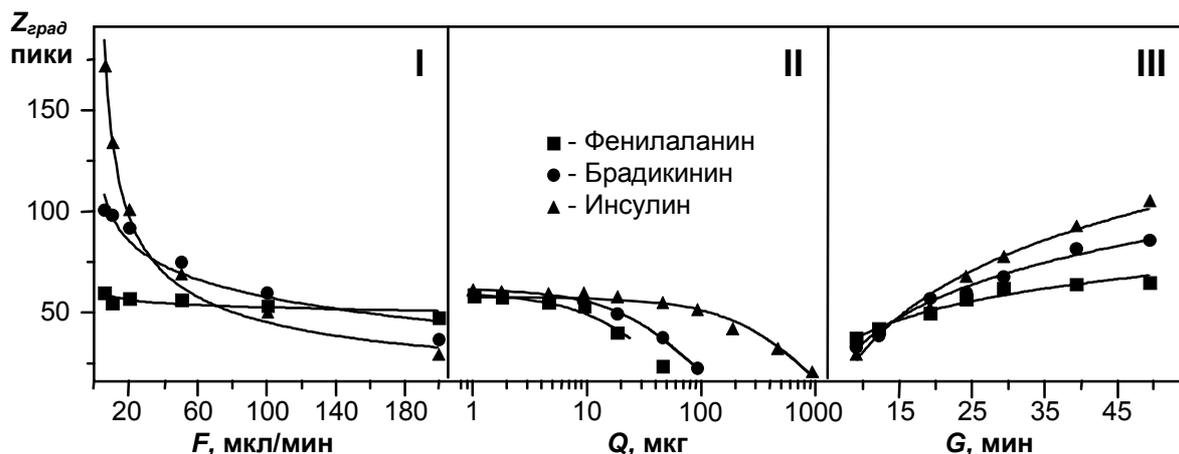


Рис. 14. ОФ МК ВЭЖХ пептидов: зависимости пиковой емкости колонки ($Z_{град}$) от скорости потока F (I), от нагрузки на колонку Q (II) и от крутизны градиента концентрации CH_3CN (0→100%) в элюенте G (III).

Хроматограф: Обь-4. **Колонка:** $\varnothing 2 \times 64$ мм; Nucleosil 100-5 C18. **Температура:** комнатная.
Элюент А: $H_2O - CF_3COOH$ (100:0.1). **Элюент В:** $CH_3CN - H_2O - CF_3COOH$ (50:50:0.1).
Градиенты: I и II- 2000 мкл от 0 до 100% В; III- от 0 до 100% В за 5, 6, 10, 12.5, 20 и 25 мин.
Скорость потока: I- 5, 10, 20, 50, 100 и 200 мкл/мин. II и III- 100 мкл/мин.
Детектор: I и III- 210 нм; II- от 210 до 290 нм (в зависимости от нагрузки).
Образцы: растворы смеси веществ в 0.1% водной трифторуксусной кислоте:
 I- 8 мкл раствора (0.5 мг/мл каждого вещества);
 II- 1, 2, 4, 10, 20, 40, 100, 200, 500 и 1000 мкл раствора (1 мг/мл каждого вещества);
 III- 6 мкл раствора (0.5 мг/мл каждого вещества).

Значение пиковой емкости колонки ($Z_{град}$) - понятие, введенное для линейной градиентной элюции в работе (M.Stadalius и др., 1985) - вычисляли как:

$$Z_{град} = \frac{G}{4\sigma} = \frac{100 \cdot t_{град} \cdot F}{4\sigma \cdot (C_1 - C_0)} \quad (6)$$

где $t_{град}$ - продолжительность линейного градиента от начальной концентрации (%) C_0 до конечной C_1 ; F - скорость потока; σ - дисперсия пика вещества.

Из 5-ти проверенных нами коммерческих ОФ с $d_p=5$ мкм (Nucleosil 100-5 C8 и C18, LiChrosorb RP8 и RP18, Servachrom C8) первые две обеспечивали в 2-3 раза большую $Z_{град}$, хотя все колонки имели близкую эффективность, измеренную по пику нафталина. Вероятно, это объясняется тем, что "плохие" фазы имели более широкое распределение пор по размерам.

В качестве гидрофобного компонента элюента из 4-х органических растворителей - метанол, этанол, ацетонитрил, 2-пропанол - предпочтение было отдано ацетонитрилу, как наименее вязкому и наиболее прозрачному в УФ-области. Тем не менее, все растворители для пары "брадикинин-инсулин" показали близкую селективность и пиковую емкость колонки. Их сила в приведенном ряду возрастает от метанола к 2-пропанолу.

При исследовании влияния нагрузки в колонку вводили растворы с одинаковой концентрацией веществ, изменяя нагрузку путем изменением объема образца. Такой прием выглядит не совсем корректным, но мы предварительно убедились, что при введении 1 мкг брадикинина, растворенного в 1 мкл и в 100 мкл, ширины его пиков совпали.

Полученные нами количественные соотношения между исследованными параметрами, позволили в дальнейшем решать практические задачи методом ОФ МК ВЭЖХ, используя его возможности в максимальной степени.

2.2.2. Определение аминокислот методом ОФ МК ВЭЖХ

Аминокислотный анализ является необходимой частью многих работ по структурным исследованиям белков и пептидов. Обычно его проводят на специализированных автоматических анализаторах, но это оправдано только при массовых анализах, а для разовых - выгоднее использовать обычный жидкостный хроматограф. С этой целью мы разработали несколько методик определения аминокислот (рис. 15) в виде УФ-поглощающих производных: фенилтиокарбаматов (ФТК); фенилтиогидантоинов (ФТГ); 1-диметиламино-нафталин-5-сульфонов (ДНС). Первая методика предназначена для количественного определения аминокислот в биологических жидкостях и в гидролизатах белков и пептидов. Вторая методика разработана для определения ФТГ-аминокислот, отщепленных от N-конца пептида по методу Эдмана при его секвенировании - установлении первичной структуры. Третья методика разработана для определения N-концевой аминокислоты после кислотного гидролиза предварительно дансильированного белка или пептида. Ее можно использовать также для полуколичественного аминокислотного состава.

2.2.3. Очистка трипсина методом ОФ МК ВЭЖХ

Протеолитический фермент трипсин широко применяется в структурной химии белка для его специфического расщепления по остаткам Lys и Arg перед секвенированием белка или для получения, так называемых, "триптических карт" (картины разделения продуктов гидролиза), позволяющих сравнивать белковые структуры между собой.

Важнейшее условие для надежного триптического картирования белков - отсутствие в препарате трипсина других протеаз, но даже высокоочищенные коммерческие препараты часто этого не гарантируют. В 1983 г. K.Titani с сотр. предложили получать чистый трипсин из коммерческих препаратов методом ОФ ВЭЖХ. Мы модифицировали его для МК ВЭЖХ, реализовав ее препаративные возможности. За одну хроматографию оказалось возможным получать до 200 мкг чистого трипсина, что достаточно для гидролиза до 10 мг белка.

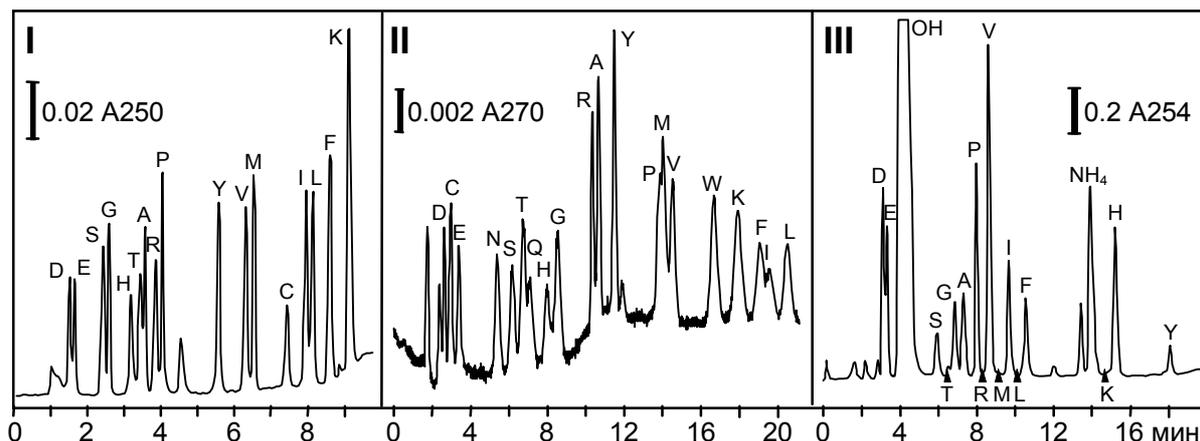


Рис. 15. Разделение ФТК- (I), ФТГ- (II) и ДНС-аминокислот (III).

Хроматограф: Обь-4. **Колонки:** I- \varnothing 1.7x75 мм; II и III- \varnothing 2x64 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: I. H_2O - 0.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6.8 - 1.0 M LiClO_4 (80:10:10).

II. CH_3CN - H_2O - 1.0 M LiClO_4 - 1.0 M CH_3COONa , pH 5.4 (22:57:10:1).

III. H_2O - 1.0 M $\text{CH}_3\text{COO-Tris}$, pH 7.2 (99:1).

Элюент В: I. CH_3CN - H_2O - 0.5 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 6.8 - 1.0 M LiClO_4 (50:20:10:20).

II. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ - H_2O - 1.0 M LiClO_4 - 1.0 M CH_3COONa , pH 5.4 (40:49:10:1).

III. CH_3CN - H_2O - 1.0 M $\text{CH}_3\text{COO-Tris}$, pH 7.2 (50:49:1).

Градиент: I. 0→40%В 6 мин; 40→100%В 8 мин.

II. 0%В 9 мин; 100%В 13 мин.

III. 0→100%В 20 мин.

Скорость потока: I- 0.2 мл/мин; II и III- 0.1 мл/мин. **Температура:** I- 60°C; II и III- комнатная.

Образцы: I. 3 мкл раствора ФТК-аминокислот (по 300 пикомолей каждой).

II. 10 мкл раствора ФТГ-аминокислот (по 20-30 пикомолей каждой).

III. 5 мкл реакционной смеси, содержащей ДНС-аминокислоты, полученные после кислотного гидролиза \approx 100 пикомолей С-концевого триптического пептида РНКазы His₁₀₅-Val₁₂₄: **HIIVACEGNPYVPVHFDASV**.

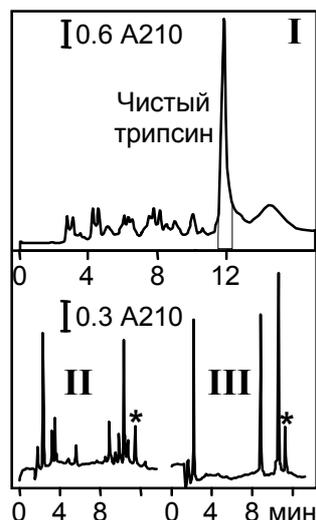


Рис. 16. Очистка трипсина от других протеаз.

I. Очистка трипсина. II. Триптический гидролизат В-цепи инсулина, полученный с помощью исходного трипсина. III. Продукты гидролиза В-цепи инсулина, полученные с помощью очищенного трипсина.

Хроматограф: Милихром-1. **Колонка:** \varnothing 2x64 мм, Nucleosil 5-C18.

Элюент А: CH_3CN - H_2O - CF_3COOH (10:90:0.1).

Элюент В: CH_3CN - H_2O - CF_3COOH (50:50:0.1).

Градиент: 0→100% В 16 мин; 100% В 4 мин. $F=0.1$ мл/мин. $P=3$ МПа.

Образцы: I- 200 мкл раствора трипсина (200 мкг; Sigma, США).

II и III- подкисленные до pH 2 гидролизаты В-цепи инсулина, полученные с помощью исходного и очищенного трипсина соответственно (*- примесь в препарате В-цепи инсулина).

Гидролиз: 15 ч, 37°C, pH 8, В-цепь инсулина/трипсин (100:10).

Трипсин использовали сразу после очистки, не удаляя CH_3CN .

Доказательством чистоты полученного трипсина является отсутствие "лишних" пиков в гидролизате В-цепи инсулина (рис. 16-III) даже при большом соотношении белок/фермент (100:10), хотя обычно его делают (100:5). Потери активности трипсина при очистке составили <10% против 50% у K.Titani. Мы

объяснили это меньшим разбавлением раствора белка при его хроматографировании на микроколонке.

2.2.4. Аффинная модификация рибонуклеазы

Аффинная модификация широко используется при изучении строения ферментов и других белков. Как правило, конечная цель таких исследований - нахождение места модификации (участок пептидной цепи или аминокислоты).

Модификацию РНКазы - фермента, состоящего из 124 аминокислот с известной первичной структурой - проводили совместно с В.Н.Буневова, которая синтезировала реагенты и доказала их аффинность. Аффинность реагенту обеспечивал негидролизуемый дезоксирибодинуклеотид - структурный аналог рибодинуклеотида, являющегося естественным субстратом РНКазы. Реакционноспособная группа реагента - азотистый иприт, алкилирующий в молекуле белка боковые радикалы аминокислот Asp, Glu, Lys, His, Tyr, Cys и концевые NH₂- и COOH-группы.

Подготовительная работа включала изучение реакционной способности реагентов и их устойчивости при разных рН, а также разработку методик контроля стадий эксперимента для достижения на каждой из них максимального выхода продукта.

Схема эксперимента: (модификация РНКзы)→(ее выделение)→(восстановление белка (разрыв -S-S-мостиков))→(карбоксиметилирование цистеинов в белке)→(расщепление белка трипсином)→(сравнение триптических карт модифицированного и нативного белков; выделение модифицированного пептида)→(установление первичной структуры модифицированного пептида).

Результаты подготовительных исследований показаны на рис. 17-19. Разделения выполняли на хроматографе "Милихром-1" (колонка Ø2x64 мм, Nucleosil 100-5 C18).

Аффинную модификацию РНКазы проводили в 0.3 М растворе NaCl при рН 8.0 в течение 8 ч при 40°C. Концентрация РНКазы составляла 3.74 мМ, а реагента ClRCH₂NHd(pTrA) - 6.36 мМ. Выбор этого реагента был обусловлен его более высокой, по сравнению с другими, константой связывания с РНКазой. Реакционную смесь обессоливали гель-фильтрацией и продукты реакции разделяли ионообменной хроматографией (рис. 20). Пики 1-4 идентифицировали как мономодифицированные РНКазы по спектральным отношениям (A280/A260)=0.44-0.52. Для РНКазы (A280/A260)=1.72 (пик 5). Уменьшение отношения (A280/A260) связано с присоединением к молекуле белка остатка реагента. Продукты 1-4 обладают меньшим по сравнению с РНКазой удерживанием, так как отрицательно заряженные нуклеотидные фосфаты частично компенсируют общий положительный заряд РНКазы. Из работы

(Х.Рогес и др. 1980) известно, что РНКазы с двумя остатками реагента, имеющего суммарный заряд -4 , на КМ-целлюлозе не удерживается.

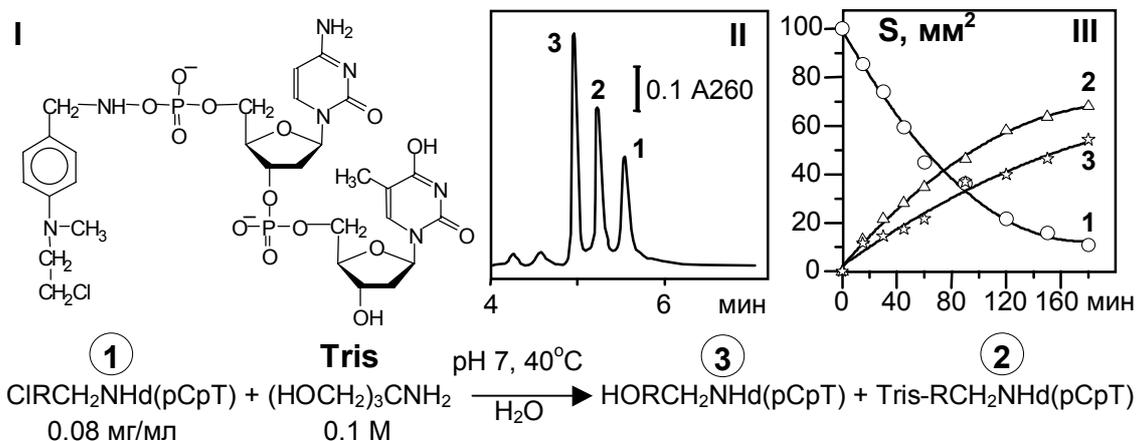


Рис. 17. Изучение реакции CIRCH₂NHd(pCpT) с Tris (I).

II. Разделение реакционной смеси через 90 мин после начала реакции.

III. Изменение концентраций компонентов смеси по изменению площадей пиков (*S*) во времени.

Элюент А: H₂O - CF₃COOH (100:0.1). **Элюент В:** CH₃CN - H₂O - CF₃COOH (50:50:0.1).

Градиент: 0→100% В за 12 мин. **F**=0.2 мл/мин. **T**: комнатная.

Образцы: по 10 мкл реакционных смесей, разбавленных в два раза 1% раствором CF₃COOH.

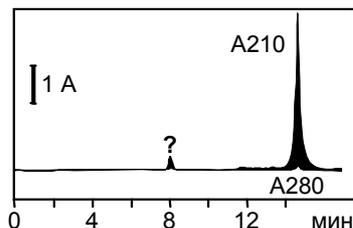


Рис. 18А. ОФ ВЭЖХ РНКазы при pH 2.

Элюент А: H₂O - CF₃COOH (100:0.1).

Элюент В: CH₃CN - H₂O - CF₃COOH (50:50:0.1).

Градиент: 0→100% В за 20 мин. **F**=0.1 мл/мин. **P**=2 МПа. **T**: комн.

Образец: 10 мкл раствора РНКазы (1 мг/мл) в элюенте А.

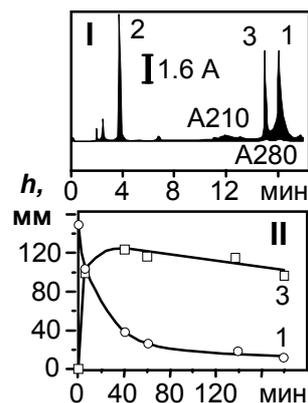
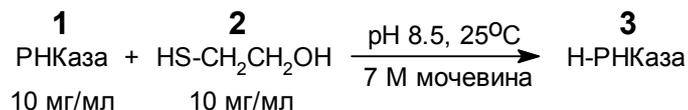


Рис. 18Б. Восстановление цистинов в РНКазе.

I. Разделение реакционной смеси:



через 5 мин после начала реакции (условия разделения на рис. 18А).
II. Кинетика реакции по высоте пиков h_{210} РНКазы и Н-РНКазы.

Образец: 5 мкл реакционной смеси через 5 мин после начала реакции, разбавленной в 10 раз 1 М раствором CF₃COOH (количество РНКазы составляет около 40 мкг).

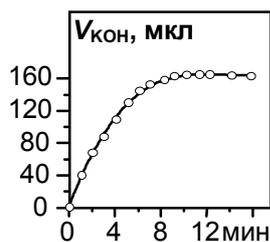
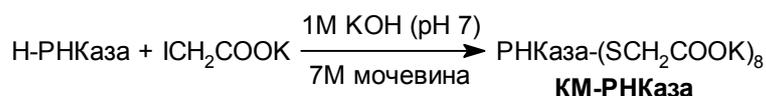


Рис. 19. Карбоксиметилирование Н-РНКазы.



Реакцию проводили при комнатной температуре в режиме pH-стата, поддерживая значение pH 7 добавлением 1 М раствора КОН.

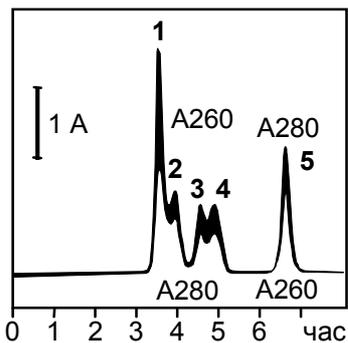


Рис. 20. Разделение продуктов реакции РНКазы с CIRCH₂NHd(pTrA).

1-4. Модифицированные продукты.
5. Непрореагировавшая РНКаза.

Колонка: Ø9x190 мм, катионообменник КМ-52.

Элюент А: 5 мМ Tris-HCl, pH 8.

Элюент В: 0.1 М NaCl - 5 мМ Tris-HCl, pH 8.

Градиент: 0→100% В 8 часов. *F*=0.4 мл/мин. *P*=0.1 МПа. *T*: комн.

Детектор: "Милихром-1".

Для локализации места присоединения реагента основной продукт реакции (пик 1 на рис. 20) был восстановлен β-меркаптоэтанолом, карбоксиметилирован йодацетатом и гидролизован очищенным по п. 2.2.3. трипсином (рис 21).

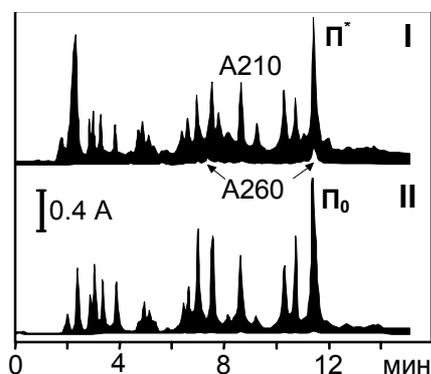


Рис. 21. Триптические карты КМ-РНКаз.

I. Модифицированная РНКаза (продукт 1 на рис. 20);

П* - модифицированный пептид.

II. Немодифицированная РНКаза (контроль).

Хроматограф: Милихром-1.

Колонка: Ø2x64 мм, Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: H₂O - CF₃COOH (100:0.1).

Элюент В: CH₃CN - H₂O - CF₃COOH (50:50:0.1).

Градиент: 0→100% В 20 мин. *F*=0.1 мл/мин. *T*: комнатн.

Образцы: по 50 мкл гидролизатов КМ-РНКаз (по 150 мкг).

Сравнение триптических карт модифицированной и исходной РНКаз на рис. 21 показывает, что модификация прошла преимущественно по одному участку молекулы белка - пептиду П*, о чем говорит заметное поглощение при $\lambda=260$ нм. Чтобы установить структуру модифицированного пептида, соответствующий ему немодифицированный пептид П₀ гидролизовали до аминокислот (6 М HCl, 105°C, 24 ч), ДНС-производные которых разделили методом ОФ МК ВЭЖХ (рис. 15-III). Так как аминокислотная последовательность РНКазы известна (D.Smyth и др., 1963), качественный аминокислотный состав пептида П₀ однозначно определил, что это - С-концевой триптический пептид РНКазы His₁₀₅-Val₁₂₄. Принимая во внимание, что модифицированная РНКаза по данным В.Н.Буновой проявляет ферментативную активность, а His₁₁₉ и Asp₁₂₁ входят в состав активного центра фермента и должны быть поэтому исключены как места модификации, вероятными местами присоединения реагента следует считать одну из других реакционно способных аминокислот: His₁₀₅, Glu₁₁₁, Tyr₁₁₅ или Val₁₂₄ (концевая COOH-группа).

Обнаруженная в данной работе множественная модификация РНКазы была неожиданной и поставила ряд общих вопросов, касающихся идеологии самого метода. Без их решения точная локализация места модификации представлялась нецелесообразной, поскольку не облегчала понимание результата.

2.2.5. Аминокислотная последовательность четырех триптических пептидов белка *E* оболочки вируса клещевого энцефалита (ВКЭ)

Целью работы являлось частичное секвенирование белка *E* оболочки ВКЭ для локализации его гена в геноме вируса, структура которого устанавливалась одновременно с нашим исследованием (М.П.Чумаков и др., 1983).

Чистый по данным электрофореза белок *E* был выделен и любезно предоставлен Е.К.Прессманом. Его гидролиз проводили в 1% водном растворе Triton X100 при рН 8 трипсином, очищенным по п. 2.2.3. Без детергента белок выпадал в осадок и не гидролизовался. Гидролизат 5 мг белка *E* был очищен от компонентов детергента и длинных пептидов как показано на рис. 22-I. за 12 хроматографий. 12 целевых фракций <P> объединяли, удаляли из раствора ацетонитрил и разделяли на 10 фракций (рис. 22-II), каждую из которых рехроматографировали при рН 7.2 (рис. 22-III), отбирая "главные" пептиды. Эти пептиды окончательно очищали рехроматографией при рН 2 с детектированием при 3-х длинах волн (рис. 22-IV) для определения спектральных отношений (A220/A210) и (A280/A210), позволяющих сделать вывод о наличии в пептидах остатков Trp и Tug, а в некоторых случаях также Phe и His. Таким образом с помощью одной только ОФ МК ВЭЖХ было выделено 25 чистых пептидов в количестве от 5 до 30 наномолей (количественная оценка по площадям пиков S210, считая, что длина пептида - 10 остатков аминокислот).

4 пептида совместно с И.В.Назимовым и В.В.Шемякиным секвенировали на секвенаторе "890 C" ("Beckman", США). ФТГ-аминокислоты идентифицировали методом ОФ МК ВЭЖХ (рис. 15-II).

Результаты по секвенированию пептидов суммированы в таблице 1. Пептид 8-3-2 является, вероятно, N-концевым пептидом белка *E*, так как его последовательность совпадает с N-концевой последовательностью белка *E*, найденной в работе (U.Voegelé и др., 1983) и по тому, что соответствующая ему последовательность нуклеотидов находится на 5'-конце гена белка.

2.2.6. Выделение эндогенного пептидного лиганда бензодиазепинового рецептора

Открытие опиоидных эндогенных пептидов, высокоспецифичных по отношению к морфинорецепторам, давало основание предположить, что существуют синтезируемые в самом организме аналогичные пептиды, специфичные по отношению к другим известным рецепторам - бензодиазепиновым - и обладающие, таким образом, психотропным действием подобно бензодиазепину. Однако, усилия ряда исследователей, направленные на выделение таких пептидных лигандов, успехом не увенчались. Мы объяснили эти неудачи двумя главными причинами:

- содержание одного пептида в 1 г исходного материала было, видимо, много меньше ожидаемых ими 10^{-8} моля;
- применение методов выделения, допускающих большое разбавление растворов (например, гель-хроматография) приводило к потере пептидов в результате их адсорбции на стенках посуды.

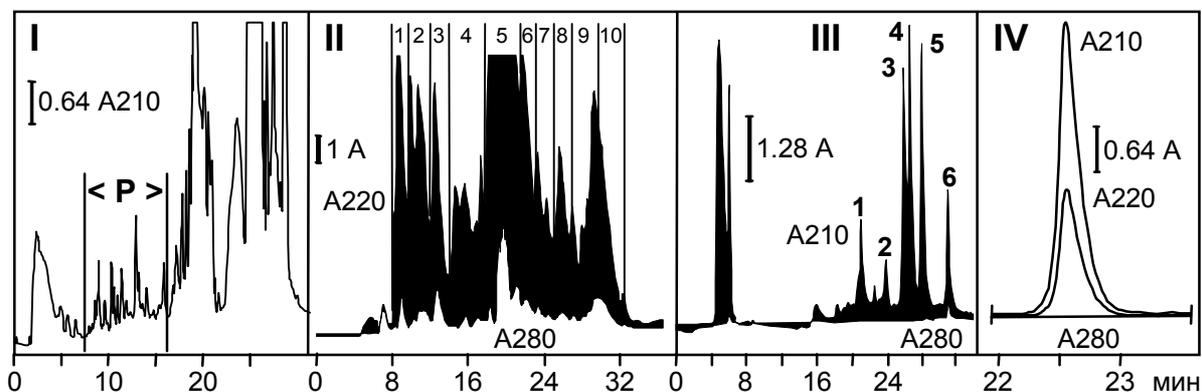


Рис 22. Выделение триптических пептидов белка *E* оболочки ВКЭ.

I. Отделение коротких и средних триптических пептидов (фракция <P>), полученных при гидролизе 500 мкг белка. II. Разделение пептидов, содержащихся в 12 объединенных фракциях <P>, на 10 фракций. III. Рехроматография фракции 8 (из хроматограммы II) при pH 7. IV. Рехроматография пептида 4 фракции 8 из хроматограммы II (см. пептид 8-4 в таблице).

Хроматограф: Милихром-1. **Колонка:** Ø2x64 мм; Nucleosil 100-5 C18. **Температура:** комнатн.

Элюенты А: I, II и IV- H₂O - CF₃COOH (100:0.1); III- H₂O - 1.0 M CF₃COO-Tris, pH 7.2 (99:1).

Элюенты В: I- CH₃CN - CF₃COOH (100:0.1); II и IV- CH₃CN - H₂O - CF₃COOH (50:50:0.1);

III- CH₃CN - H₂O - 1.0 M CF₃COO-Tris, pH 7.2 (50:49:1).

Градиенты: I- 0→50% В за 20 мин; остановка и заполнение насоса; 50→100% В за 10 мин;

II, III и IV- 0-100% В за 40 мин.

Скорость потока: I- 0.1 мл/мин; II, III и IV- 0.05 мл/мин. **T:** комнатная.

Образцы: I. 250 мкл гидролизата (≈500 мкг белка). II-IV. 25-100 мкл растворов пептидов.

Таблица 1. Последовательность аминокислот некоторых пептидов белка *E*.

Вверху - последовательность аминокислот по данным секвенирования, внизу - по данным определения последовательности нуклеотидов.

Шифр пептида	Последовательность аминокислот	A220 A210	A280 A210
4-3	----Glu-Gly-Ala-Gln-Asn-Trp-Asn-Asn----Glu- Thr-Glu-Gly-Ala-Gln-Asn-Trp-Asn-Asn-Ala-Glu-Arg	0.95	0.16
8-3-2	----Val-Leu-Ile-----Ser-----Ala-Gln-Gly-Asp-Leu- Ser-Val-Leu-Ile-Pro-Ser-His-Ala-Gln-Gly-Asp-Leu-Thr-Gly-Arg	0.49	0
10-1	----Leu-Glu-Gly-Asp-----Leu- Trp-Leu-Glu-Gly-Asp-Ser-Leu-Arg	1.00	0.16
8-4	Leu-Val-----Phe-----Ala-Val-Lys Leu-Val-Glu-Phe-Gly-Ala-Pro-His-Ala-Val-Lys	0.49	0

Наш план предусматривал проводить выделение пептидных лигандов, используя только ОФ ВЭЖХ при максимальной нагрузке на колонку (т.е. при большой концентрации растворов), исходя из предположения, что содержание одного искомого пептида в исходном материале составляет 10^{-10} моля/г. Это

позволяло надеяться, что из 25 г гипофиза теленка, взятых в качестве сырья, удастся выделить около 10^{-10} моля пептида, что должно было хватить для полного или частичного секвенирования. До 95% пептида допускалось потерять при многостадийном выделении и при проверке фракций на проявление ингибирующей активности по отношению к специфическому связыванию меченого ^3H -диазепама с бензодиазепиновыми (БДА) рецепторами.

Работа проводилась совместно с В.В.Плотниковым и Т.Б.Кудряковой. Гипофизы телят забирались сразу после забоя животных и хранились в жидком азоте. Схема выделения "активного" пептида приведена на рис. 23. Она предусматривала все меры предосторожностей, связанные с возможным протеолизом пептидов. Концентрирование пептидов из экстракта проводили методом твердофазной экстракции на ОФ. Первоначальное фракционирование (рис. 24-Ia) осуществляли на хроматографе, включающем в себя: 2 насоса **510**, градиентный контроллер **680**, инжектор U6K, колонку $\text{Ø}8 \times 100$ мм с Novapak-5 C18 в "Z-модуле" для радиального сжатия (все фирмы "Waters", США) и детектор хроматографа "Милихром-1". Из двух "активных" фракций (рис. 24-Ib) для дальнейшей очистки выбрали фракцию "2", так как она содержала меньше вещества и, тем самым, имела большую удельную ингибирующую активность. Все последующие хроматографии (рис. 22-II-V) проводили на хроматографе "Милихром-1" с колонкой $\text{Ø}2 \times 64$ мм (Nucleosil 5-C18). Как и при очистке пептидов белка *E* оболочки ВКЭ, изменение селективности при рехроматографии осуществляли изменением рН элюента от 2 до 7.

25% выделенного хроматографически чистого вещества "2-2-1" гидролизовали очищенным по п. 2.2.3. трипсином. Полученная в результате картина разделения продуктов протеолиза (рис. 24-V) свидетельствуют о том, что вещество "2-2-1" расщепилось полностью и является пептидом, содержащим в сумме не менее 4-х остатков Lys и Arg. Если принять, что средняя длина триптического пептида составляет 10-20 аминокислотных остатков, то длина пептида "2-2-1" должна быть 40-80 остатков ($M \approx 4000-8000$). Отметим, что для пептида "2-2-1" спектральное отношение (A_{280}/A_{210}) ≈ 0.01 . Это позволяет утверждать, что он не содержит Trp и Tyr.

К сожалению, попытка секвенировать пептид "2-2-1" была неудачной. Мы объяснили это или малым количеством пептида (по оценке 100 пикомолей), или тем, что его N-конец оказался заблокирован. Предварительная проверка второго предположения не делалась, так как потребовала бы около 50 пикомолей пептида, что совсем исключило бы возможность определения его аминокислотной последовательности.

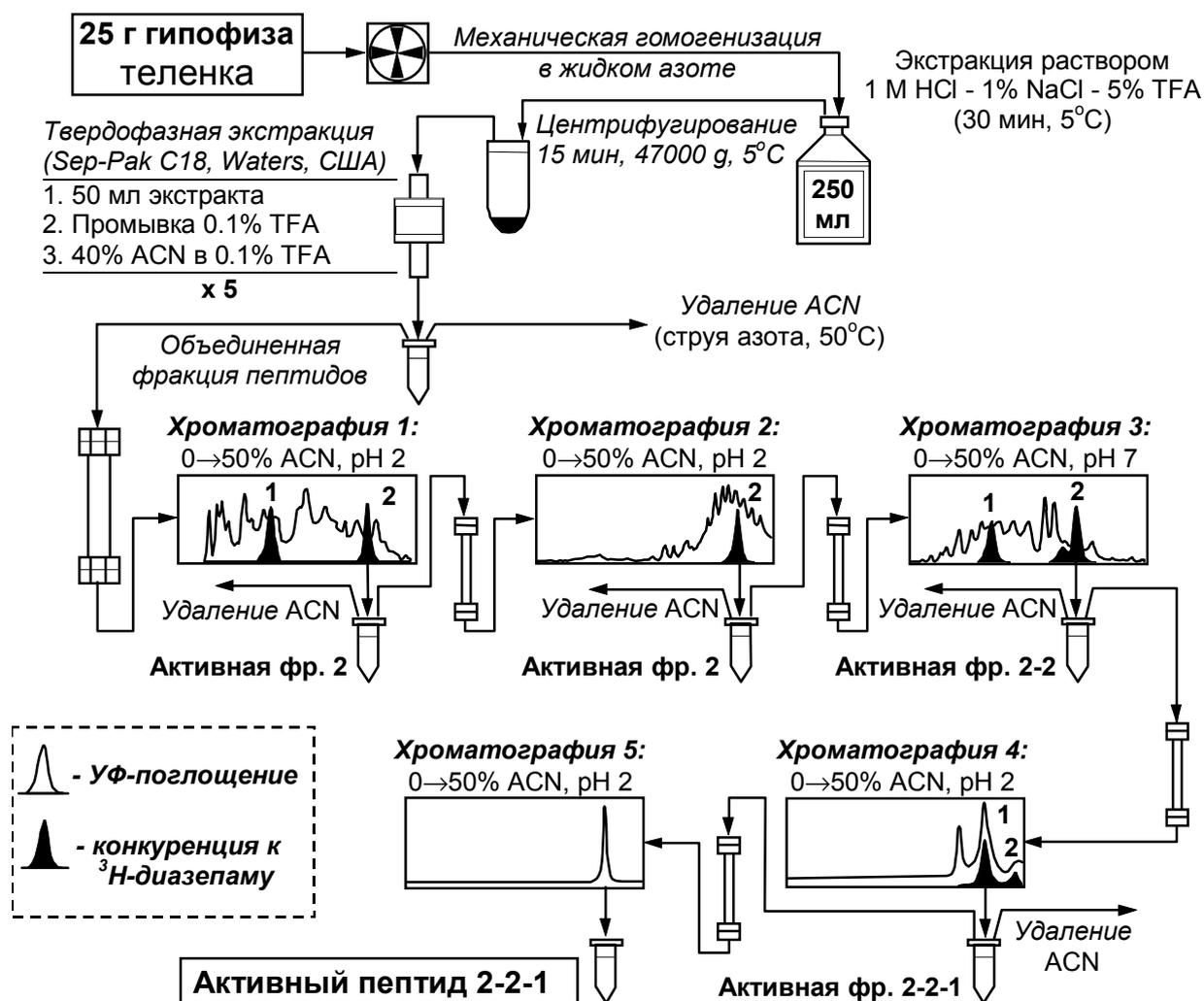


Рис. 23. Схема выделения пептидного лиганда бензодиазепиновых рецепторов.

2.2.7. Установление первичной структуры миоглобина байкальской нерпы

Еще одно важное приложение микропрепаративной ОФ МК ВЭЖХ - ее применимость для полного секвенирования молекулы белка по Эдману путем секвенирования пептидов, выделенных из его ферментативных гидролизатов.

С помощью этого метода совместно с Н.Г.Маликовым, И.В.Назимовым и В.В.Шемякиным мы установили всю первичную структуру миоглобина байкальской нерпы *Phoca sibirica* (рис 25), которая оказалась идентичной структурам миоглобинов тюленей *Phoca vitulina larga* и *Halechoerus gryphus*. Это говорит о том, что они отделились от общего предка в последние 7 млн. лет.

Разделение всех гидролизатов осуществляли в одних и тех же условиях, обеспечивающих необходимое разрешение пиков (рис. 26). Пептиды секвенировали на газофазном секвенаторе "477A" и ФТГ-анализаторе фирмы "Applied Biosystems" (США). Отбор пептидов на секвенирование производили по

данном аминокислотного анализа, выполняемого на анализаторе "Pico Tag" ("Waters", США).

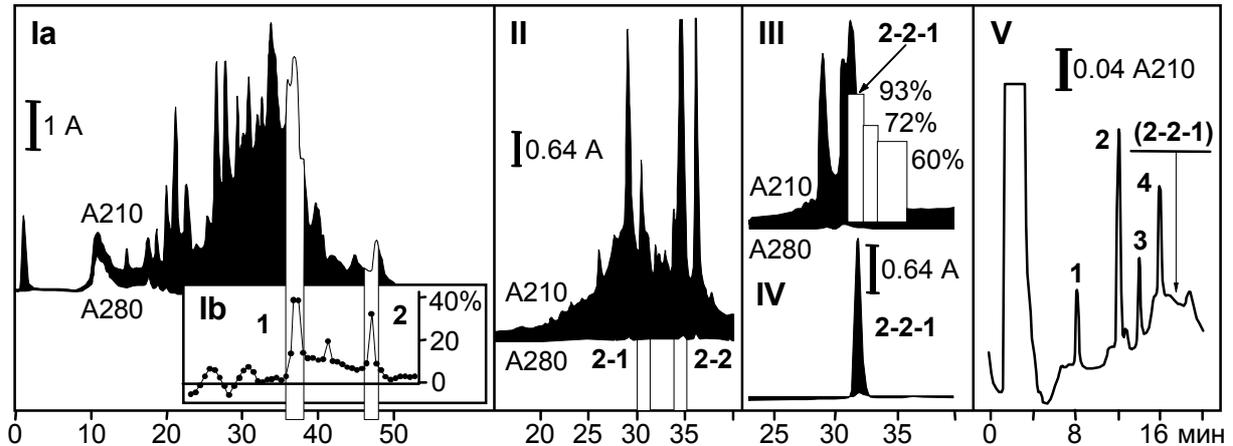


Рис. 24. Выделение эндогенного пептидного лиганда БДА-рецептора.

I. Фракционирование экстракта из 25 г гипофиза теленка. Ia. Кривые УФ-поглощения A210 и A280; Ib. Соответствующая кривая ингибирующей активности связывания ^3H -дiazепама с рецепторами. II. Рехроматография фракции 2 (рис. Ib) при pH 7 (2-1 и 2-2 - активные фракции). III. Рехроматография фракции 2-2 при pH 2 (максимально активная фракция - 2-2-1). IV. Рехроматография фракции 2-2-1 для проверки гомогенности. V. Разделение триптического гидролизата вещества 2-2-1.

Элюенты А: I, III, IV и V. H_2O - TFA (100:0.1). II. H_2O - 0.1 M TFA-Tris, pH 7.0 (90:10).

Элюенты В: I, III, IV и V- ACN- H_2O -TFA (50:50:0.1). II- ACN- H_2O -0.1 M TFA-Tris, pH 7 (50:40:10).

Градиенты: I. 0→100% В 50 мин. II и III. 0→100% В 40 мин. IV- 0→100% В 22 мин.

Скорости потока: I- 2; II и III- 0.05; IV- 0.1 мл/мин. T: комнатная.

Образцы: I. 20 мл раствора экстракта из 25 г гипофиза. II. 500 мкл раствора веществ фракции 2 (из Ib). III. 25 мкл раствора фракции 2-2 (из II). IV. 25 мкл раствора фракции 2-2-1 (из III). V- 25 мкл раствора триптического гидролизата вещества фракции 2-2-1 (из IV).

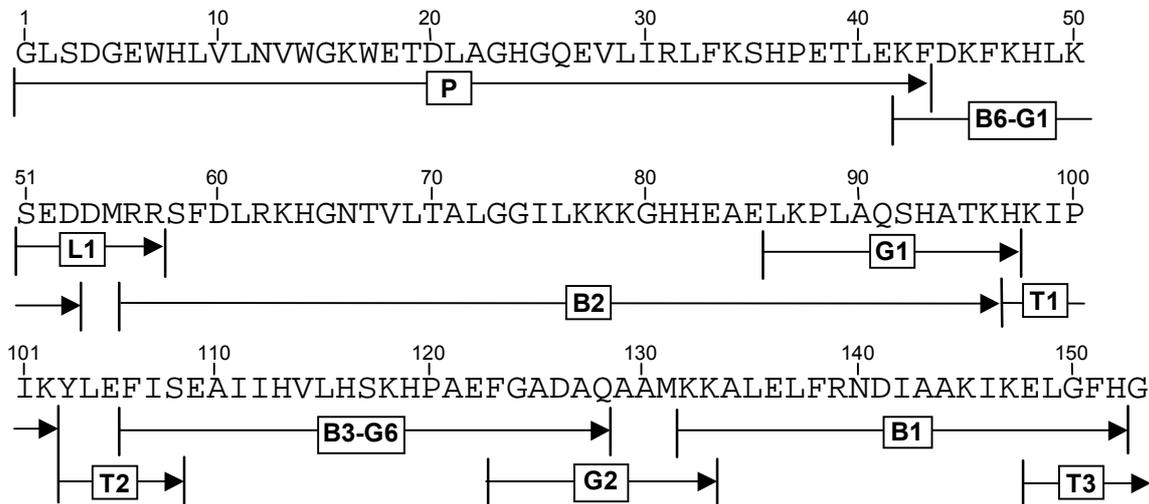


Рис. 25. Первичная структура миоглобина байкальской нерпы.

Указаны последовательность аминокислот, установленная при секвенировании всей молекулы миоглобина (P), пептиды бромцианового расщепления (B), гидролиза трипсином (T), глутаминовой протеиназой (G), лизинспецифической протеиназой (L). Отмечены только те пептиды, полная или частичная структура которых была необходима для реконструкции первичной структуры белка.

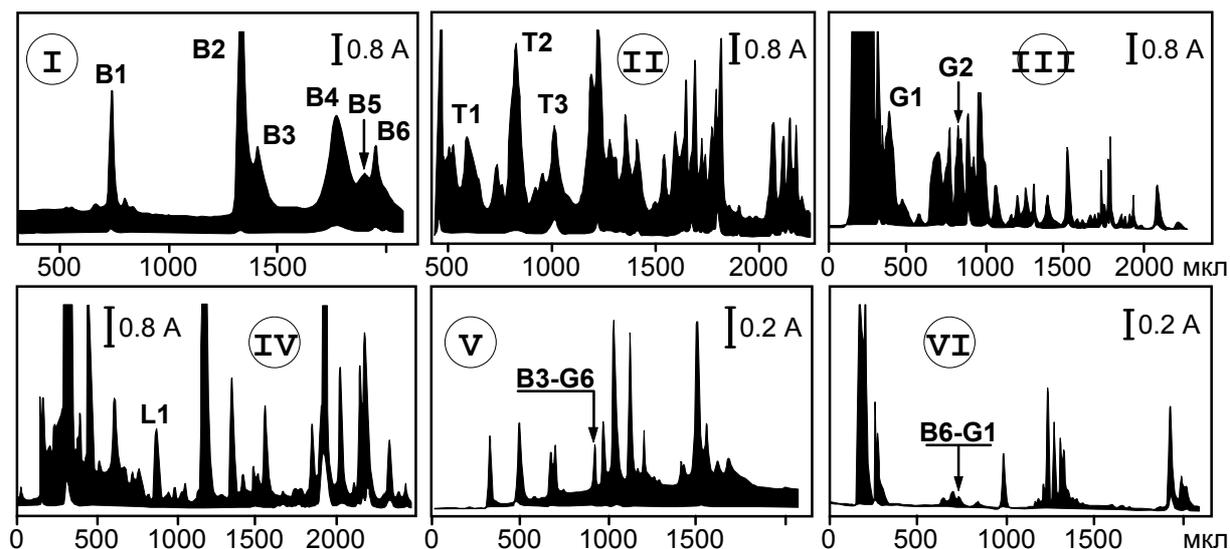


Рис. 26. Выделение пептидов-фрагментов миоглобина байкальской нерпы.

Продукты расщепления миоглобина бромцианом (I), трипсином (II), эндопротеиназами Glu-C (III) и Lys-C (IV). Гидролизаты бромциановых пептидов B3 (V) и B6 (VI) эндопротеиназой Glu-C.
Хроматограф: Милихром-1. **Колонка:** $\varnothing 2 \times 64$ мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты А: $\text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (100:0.1). **Элюенты В:** $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (50:50:0.1).
Градиенты: 0→100% В 50 мин. $F=0.05$ мл/мин. $P=1$ МПа. **T:** комнатн. **Детектор:** 210 и 280 нм.
Образцы: по 50 мкл водных растворов пептидов с pH 2-3.

2.2.8. Установление первичной структуры пептидов с применением масс-спектрометрии

Альтернативным методу секвенирования белка по Эдману является масс-спектрометрический, один из вариантов которого был разработан нами совместно с Институтом аналитического приборостроения НТО АН СССР. Суть его заключалась в том, что к N-концу пептида присоединялась ДНС-группа, после чего ДНС-пептид выделяли из реакционной смеси с помощью ОФ МК ВЭЖХ (как в случае ДНС-брадикинина на рис 27), затем ДНС-пептид подвергали неполному кислотному гидролизу, при котором получалась статистическая смесь пептидов двух видов - с ДНС-группой на N-конце и без нее. Реакционную смесь вводили непосредственно в масс-спектрометр, снабженный оригинальным устройством формирования ионного пучка, названным ЭРИАД (Экстракция Растворенных Ионов при Атмосферном Давлении). Полученные масс-спектры содержали только линии положительных одно- и более заряженных квазимолекулярных ионов и не содержали линии осколков.

В случае коротких пептидов масс-спектры гидролизата весьма просты (рис. 28) и линии ионов ДНС-пептидов выявляются легко. Так как их соседние линии соответствуют пептидам, отличающимся только на один аминокислотный

остаток, как показано в таблице на рис. 28, то по разнице масс этих ионов структура пептида "читается с листа".

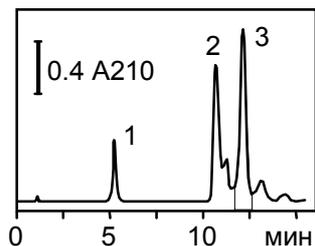
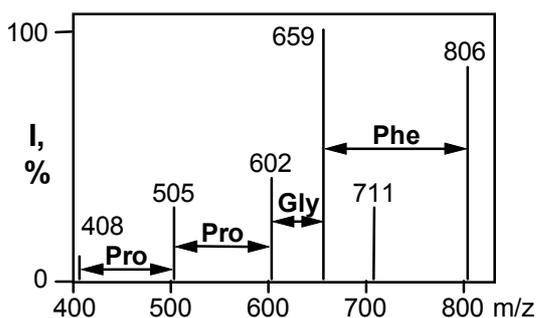


Рис. 27. Отделение ДНС-брадикинина (3) от исходного брадикинина (2) и ДНС-ОН (1).

Хроматограф: Милихром-1. **Колонка:** Ø2x62 мм, Nucleosil 5-C18. **Элюент А:** H₂O - ТФУ (100:0.1). **Элюент В:** CH₃OH - ТФУ (100:0.1). **Градиент:** 0→100% В за 25 мин. **F=0.1** мл/мин. **T:** комнатная. **Образец:** 10 мкл реакционной смеси дансирования брадикинина.



MH^+	ДНС-пептид
1293	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
1137	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe
990	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro
893	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser
806	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe
659	ДНС-Arg-Pro-Pro-Gly
602	ДНС-Arg-Pro-Pro
505	ДНС-Arg-Pro
408	ДНС-Arg

Рис. 28. Масс-спектр продуктов неполного кислотного гидролиза ДНС-брадикинина и перечень всех возможных ДНС-пептидов, образующихся из него в результате гидролиза.

Для практической реализации этого метода совместно с И.В.Назимовым и др. мы оптимизировали условия реакции микроколичеств пептида ($<10^{-9}$ моля) с 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлоридом (ДНС-Cl) - концентрацию пептида, избыток реагента, pH, тип буфера и органического растворителя и их концентрации - с целью получения ДНС-пептида с выходом $>90\%$. Выделяли продукт из реакционной смеси методом ОФ МК ВЭЖХ. На примере брадикинина было показано, что для установления его полной аминокислотной последовательности достаточно менее 1 наномоля пептида. Вся работа - от реакции дансирования до "чтения структуры" из масс-спектра - занимает не более часа, тогда как секвенирование брадикинина по Эдману требует примерно 6 часов.

2.2.9. Общие преимущества МК ВЭЖХ перед обычной ВЭЖХ при работе с пептидами и белками

После того, как мы показали применимость нашего метода МК ВЭЖХ для решения простых и комплексных аналитических задач, характерных для структурной химии белка, полезно сравнить его с обычной ВЭЖХ.

Длина колонки. Как следует из модели стехиометрического вытеснения (F.Regnier, X.Geng, 1984), правильность которой по отношению к белкам доказана многими экспериментами, константа адсорбции белков чрезвычайно

зависима от силы элюента и поэтому их следует хроматографировать *только* в градиентном режиме. Поскольку белок может находиться в колонке практически либо полностью адсорбированным в верхней ее части, либо растворенным в элюенте, то та часть колонки, которая не участвует в адсорбции белка, является "лишней", способствующей дополнительному размыванию пиков. Отсюда следует очевидное - длина колонки должна быть минимизирована. Оставаясь достаточно эффективной, короткая колонка имеет три важных преимущества: уменьшает расход элюента, ускоряет разделение, уменьшает рабочее давление. Однако, многие фирмы упорно продолжают производить колонки "для белков и пептидов" длиной до 250 мм. Мы объясняем такой консерватизм тем, что они поставляют их для работы в со "стандартным" хроматографическим оборудованием. Но "стандартные" (плунжерные) насосы дают заметную пульсацию потока при низких и средних давлениях, характерных для коротких колонок, и, тем самым, не позволяют использовать эти колонки по техническим причинам.

Объем колонки определяет ее емкость по отношению к веществу образца. Колонки $\varnothing 2 \times 60-80$ мм с типичными ОФ сохраняют эффективность, если количество пептида не превышает 10 мкг, а белка - до 100 мкг и более (рис. 14-П). Такой масштаб наиболее употребителен в структурной химии белка, а при работе с дефицитным материалом его стремятся еще уменьшить. Особое значение здесь имеет концентрация растворов. Боковые радикалы аминокислот придают участкам молекулы белка настолько разные свойства, что практически нет материалов, к которым бы они не "прилипали" и, тем самым, "терялись" из раствора. Потери пропорциональны площади смачиваемой поверхности. По нашим данным для растворов инсулина в 0.1% CF_3COOH , имеющих концентрацию 10, 100 и 1000 мкг/мл, через 24 ч в пробирках из полипропилена концентрации снизились соответственно на 80, 20 и 1%. В стеклянных пробирках потери составили 40, 5 и <1%. Так как колонки $\varnothing 4.6 \times 250$ мм "разбавляют" одни и те же растворы веществ в 10-20 раз больше, чем наши микроколонки, то последние имеют, в этом смысле, очевидное преимущество.

Способ ввода образца в колонку, реализованный в хроматографах "Милихром", позволяет *без потерь* вводить в колонку от 1 до 2.5 мл и более раствора, что важно для сохранения вещества при многих рехроматографиях.

Обобщая сказанное выше, рискнем назвать наш масштаб МК ВЭЖХ "оптимальным" для структурных исследований белка, а "Милихромы", имеющие многоволновые УФ-детекторы - "оптимальными" хроматографами.

2.3. МК ВЭЖХ в аналитической химии окружающей среды

2.3.1. Постановка задачи

Проникновение ВЭЖХ в аналитическую химию окружающей среды, несмотря на ее широчайшие возможности, происходит весьма медленно и, чтобы найти в данной области "свое место", важно было понять причины такого невнимания к этому методу. Они нам казались следующими:

1. "Главная" или "официальная" часть данного раздела аналитической химии - *охрана окружающей среды* - консервативна. Природоохранное законодательство с его юридическими требованиями и нормами допускает внедрение новых методов только после долгого этапа апробации. Предпочтение отдается, очевидно, старым, метрологически хорошо обоснованным и стандартизированным методам. ВЭЖХ в эти рамки не вписывалась.
2. Главное внимание обращается на атмосферные пути загрязнения окружающей среды, т.е. загрязнение ее летучими соединениями. "Официальный" список таких загрязнителей быстро увеличивается и образцы часто содержат много десятков аналитов, которые надо не только разделить, но и безошибочно идентифицировать. Здесь вне конкуренции пока тандем "капиллярный газовый хроматограф→масс-спектрометр."
3. Многие исследования объектов окружающей среды часто иницируются не их целесообразностью, а возможностью имеющейся аппаратуры и методик. При большом количестве анализов важное значение приобретает экономическая сторона дела, а типичная ВЭЖХ - весьма дорогостоящий метод.
4. Важнейшее значение для аналитической химии окружающей среды имеют методы и аппаратура, позволяющие проводить анализы непосредственно на месте отбора проб (*in situ*). Возможность быстро получать информацию и оперативно принимать решения, делает ненужной транспортировку образцов в стационарные лаборатории и исключают ошибки, связанные с их хранением. "Полевой" серийной аппаратуры для ВЭЖХ не было.

Обозначив проблемы, препятствующие, внедрению ВЭЖХ в аналитическую химию окружающей среды, мы решали их на основе ранее разработанного метода МК ВЭЖХ, который в сочетании с многоволновой УФ-детекцией обладает большой универсальностью по отношению к различным анализам и обеспечивает высокую достоверность результатов. Для реализации преимуществ МК ВЭЖХ важное внимание уделялось постановке самих аналитических задач. Был спроектирован и апробирован в "полевых условиях" хроматограф "Милихром А-02".

2.3.2. Разделение типичных экотоксикантов методом МК ВЭЖХ

О возможностях метода МК ВЭЖХ для решения типовых задач, характерных для аналитической химии окружающей среды, свидетельствуют примеры, приведенные на рис. 29.

Фактически все эти разделения включены в официальные методы анализа Агентства по охране окружающей среды США (US EPA), которые предполагают их выполнение на обычных колонках. МК ВЭЖХ, обеспечивая приемлемое разрешение пиков, экономически предпочтительнее.

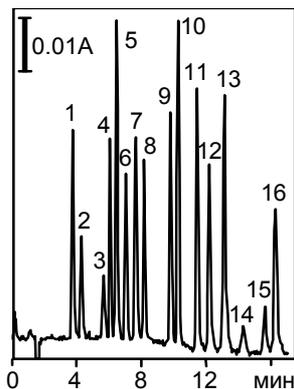
2.3.3. Групповое определение экотоксикантов в природных водах

Многие вещества, являющиеся контролируемыми загрязнителями окружающей среды, относятся к большим группам соединений, подобных по химическим свойствами и по токсичности. Если такие группы насчитывают десятки веществ, определение каждого из них по отдельности становится, с одной стороны, весьма сложным, а с другой - не всегда оправданным. В этих случаях в качестве предварительной оценки целесообразно проводить групповой анализ, результаты которого будут основанием для принятия решение о дальнейшем исследовании объекта.

Говоря о загрязнении поверхностных вод, групповое определение экотоксикантов можно базировать как на прямом методе анализа, так и на косвенном, используя в качестве природных концентраторов водные организмы, способные накапливать в себе эти вещества. Основываясь на втором принципе, мы разработали пригодные для химического мониторинга методы оценки загрязнения воды хлорфенолами, фталатами, инсектицидом DDT и его метаболитами.

Хлорфенолы (ХФ) - антропогенные экотоксиканты, попадающие в больших количествах в природные водоемы со сточными водами целлюлозных производств, использующих хлор для отбеливания. Благодаря своей химической устойчивости, ХФ накапливаются в окружающей среде. Концентрация индивидуальных ХФ в природных водах редко превышает 1-2 мкг/л, а количество их изомеров в сточных водах составляет несколько десятков.

I. Полициклические ароматические углеводороды.



Хроматограф: Милихром-1 с двухприцевым градиентным насосом.

Колонка: $\varnothing 2 \times 80$ мм; Nucleosil 5-C18 PAH.

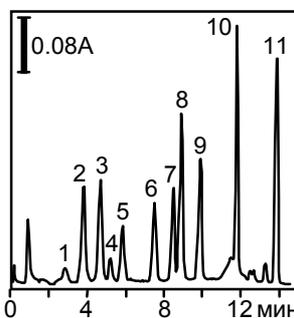
Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (80:20). **Элюент В:** CH_3CN .

Градиент: 0 \rightarrow 100% В 9 мин; 100% В 8 мин.

$F=0.12$ мл/мин. $P=2$ МПа. T : комнатная. $\lambda=254$ нм.

Образец: 2 мкл раствора веществ в метаноле: **1-** нафталин (40 нг); **2-** ацинафтилен (32 нг); **3-** аценафтен (40 нг); **4-** флуорен (10 нг); **5-** фенантрен (6 нг); **6-** антрацен (2 нг); **7-** флуорантен (16 нг); **8-** пирен (10 нг); **9-** бензо[а]антрацен (8 нг); **10-** хризен (8 нг); **11-** бензо[б]-флуорантен (8 нг); **12-** бензо[к]флуорантен (10 нг); **13-** бензо[а]пирен (10 нг); **14-** дибензо[а, h]антрацен (8 нг); **15-** бензо[g, h, i]перилен (8 нг); **16-** индено[1, 2, 3-сd]пирен (8 нг).

II. Фенолы.



Хроматограф: Милихром А-02 (макет).

Колонка: $\varnothing 2 \times 64$ мм; Eurosphere 80-5 C18.

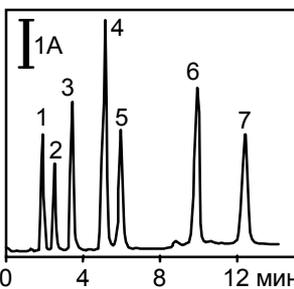
Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (36:63.9:0.1) **Элюент В:** CH_3OH .

Градиент: 0 \rightarrow 68% В 11 мин; 68 \rightarrow 100% В 1 мин; 100% В 5 мин.

$F=0.2$ мл/мин. $P=4$ МПа. $T=45^\circ\text{C}$. $\lambda=240$ нм.

Образец: 2 мкл раствора веществ в CH_3OH (по 225 нг каждого): **1-** фенол; **2-** 4-нитрофенол; **3-** 2,4-нитрофенол; **4-** 2-нитрофенол; **5-** 2-хлорфенол; **6-** 2-метил-4,6-динитрофенол; **7-** 2,4-диметилфенол; **8-** 4-хлор-3-метилфенол; **9-** 2,4-дихлорфенол; **10-** 2,4,6-трихлорфенол; **11-** пентахлорфенол.

III. Хлорфенолы.



Хроматограф: Милихром-1.

Колонка: $\varnothing 2 \times 64$ мм; Silasorb C18 (5 мкм).

Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (70:30:0.1).

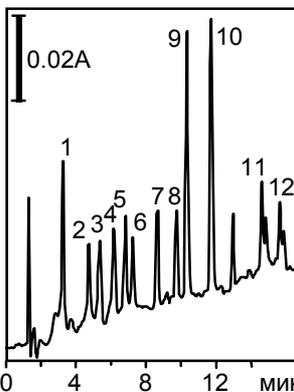
Элюент В: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (80:20:0.1).

Градиент: 100% А 7 мин; 100% В 8 мин

$F=0.1$ мл/мин. $P=3$ МПа. T : комнатная. $\lambda=210$ нм.

Образец: 4 мкл раствора веществ в CH_3OH (по 4 мкг каждого): **1-** фенол; **2-** 4-хлорфенол; **3-** 2,5-дихлорфенол; **4-** 4,5,6-трихлорфенол; **5-** тетрахлоркатехол; **6-** тетрахлоргваякол; **7-** пентахлорфенол.

IV. Пестициды: хлорароматические кислоты и их эфиры.



Хроматограф: Милихром А-02 (макет).

Колонка: $\varnothing 2 \times 64$ мм; Eurosphere 80-5 C18.

Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{COOH}$ (100:100:1).

Элюент В: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{COOH}$ (180:20:1).

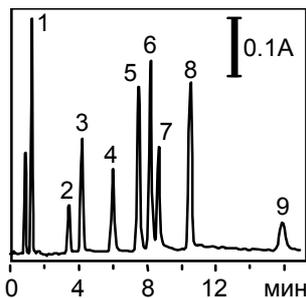
Градиент: 0 \rightarrow 20% В 1 мин; 20 \rightarrow 100% В 12 мин; 100% В 3 мин.

$F=0.15$ мл/мин. $P=3$ МПа. $T=45^\circ\text{C}$. $\lambda=220$ нм.

Образец: 2 мкл раствора веществ: **1-** банвел (320 нг); **2-** 2,4-Д (160 нг); **3-** диурон (160 нг); **4-** 2,4,5-Т (160 нг); **5-** 2,4-Д метиловый эфир (160 нг); **6-** 2,4-ДБ (160 нг); **7-** 2,4,5-Т метиловый эфир (160 нг); **8-** 2,4-ДБ метиловый эфир (160 нг); **9-** дактал (160 нг); **10-** трифлуралин (внутренний стандарт, 80 нг); **11-** 2,4-Д изооктиловый эфир (320 нг); **12-** 2,4,5-Т изооктиловый эфир (320 нг).

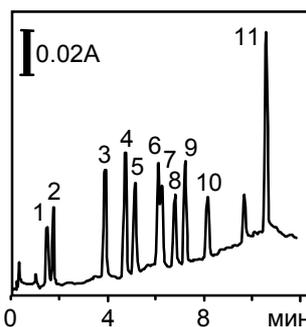
Рис. 29. Примеры разделения важнейших экотоксикантов методом МК ВЭЖХ.

V. Пестициды: триазины и другие гетероциклы.



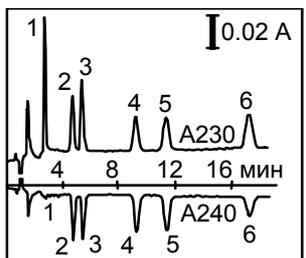
Хроматограф: Милихром А-02 (макет).
Колонка: Ø2x64 мм; Eurosphere 80-5 C18.
Элюент А: CH₃CN - H₂O - 1 М CH₃COONa, pH 5.75 (30:69:1).
Элюент В: CH₃CN - H₂O - 1 М CH₃COONa, pH 5.75 (50:49:1).
Градиент: 0→100% В 10 мин; 100% В 8 мин.
F=0.2 мл/мин. P=3 МПа. T=45°C. λ=220 нм.
Образец: 2 мкл раствора (по 100 нг): 1- бентазон; 2- тебутиурон (200 нг); 3- симазин; 4- атразин; 5- прометон; 6- пропазин; 7- гутион; 8- прометрин; 9- диазинон (400 нг).

VI. Пестициды: карбаматы и мочевины.



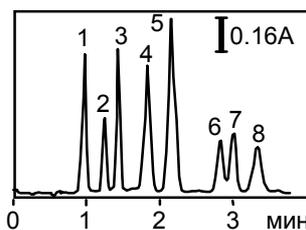
Хроматограф: Милихром А-02 (макет).
Колонка: Ø2x64 мм; Eurosphere 80-5 C18.
Элюент А: CH₃OH - H₂O - 1 М CH₃COONa, pH 5.0 (35:64:1).
Элюент В: CH₃OH - H₂O - 1 М CH₃COONa, pH 5.0 (85:14:1).
Градиент: 0→100% В 10 мин; 100% В 3 мин.
F=0.2 мл/мин. P=4 МПа. T=45°C. λ=230 нм.
Образец: 2 мкл раствора веществ: 1-бентазон (20 нг); 2-метомил (20 нг); 3-алдикарб (200 нг); 4-бендиокарб (200 нг); 5-тебутиурон (40 нг); 6-пропахлор (200 нг); 7-диурон (20 нг); 8-пропанил (20 нг); 9-хлорпрофам (20 нг); 10-метолахлор (200 нг); 11-триаллат (200 нг).

VII. Хлорароматические пестициды.



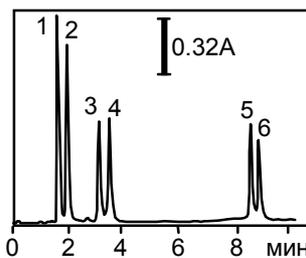
Хроматограф: Милихром А-02 (макет).
Колонка: Ø2x64 мм; Eurosphere 80-5 C18.
Элюент: CH₃OH - H₂O (80:20).
F=0.2 мл/мин. P=3 МПа. T=45°C.
Предобразец: 5 мкл воды.
Образец: 5 мкл раствора веществ в CH₃OH (по 25 нг каждого): 1- 1,4-дихлорбензол; 2- 4,4'-метоксиклор; 3- 4,4'-DDD; 4- 4,4'-DDT; 5- 4,4'-DDE; 6- гексахлорбензол.

VIII. Нитросоединения.



Хроматограф: Милихром А-02 (макет).
Колонка: Ø2x64 мм; Eurosphere 80-5 C18.
Элюент: CH₃OH - 0.01 М (H-C₄H₉)₄NH₂PO₄, pH 6.8 (50:50).
F=0.28 мл/мин. P=5 МПа. T=45°C. λ=230 нм.
Образец: 3 мкл раствора веществ (по 150 нг): 1- октаген; 2- гексаген; 3- тринитробензол (75 нг); 4- тетрил; 5- ТНТ (75 нг); 6- 2,4-динитротолуол; 7- 2,6-динитротолуол; 8- пикриновая кислота.

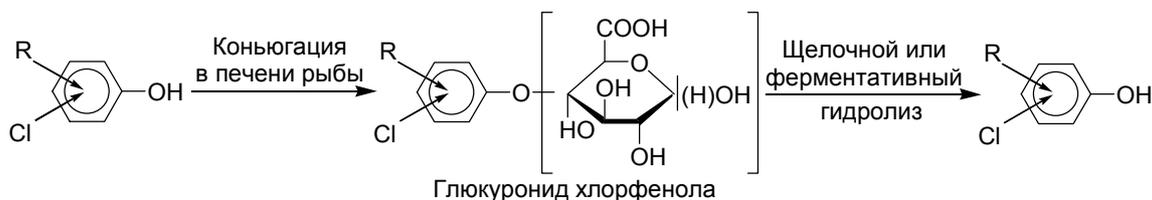
IX. Диэфиры орто-фталевой кислоты.



Хроматограф: Милихром А-02 (макет).
Колонка: Ø2x64 мм; Eurosphere 80-5 C18.
Элюент А: CH₃CN - H₂O (80:20). **Элюент В:** CH₃CN.
Градиент: 100% А 3 мин; 0→100% В 1 мин; 100% В 4 мин.
F=0.1 мл/мин. P=2 МПа. T=50°C. λ=230 нм.
Образец: 2 мкл раствора веществ в CH₃OH (по 400 нг каждого): 1- диметилфталат; 2- диэтилфталат; 3- ди-*n*-бутилфталат; 4- *n*-бутилбензилфталат; 5- бис(2-этилгексил)фталат; 6- ди-*n*-октилфталат.

Рис. 29 (продолжение). Разделение некоторых экотоксикантов МК ВЭЖХ

Разработанный нами групповой метод определения суммы ХФ в воде, основан на известной способности рыб накапливать ХФ в результате дыхания. Через жабры ХФ попадают с кровью в печень и затем, если рыба лишена пищи, в виде глюкуронидов накапливаются в желчи, где их концентрация может в 500000 раз превышать концентрацию ХФ в воде. Зная это соотношение (коэффициент аккумуляции KA), по количеству ХФ в желчи можно вычислить их концентрацию в воде:



Накопление ХФ в желчи мы предварительно исследовали на примере аккумуляции тетрахлоргваякола ельцом *L. leuciscus baikalensis* (рис. 30).

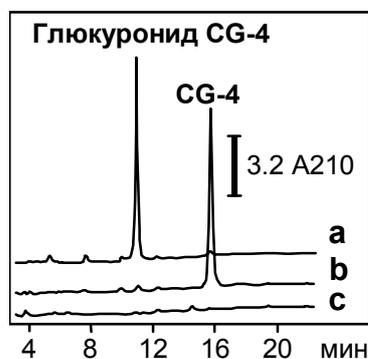


Рис. 30. Тетрахлоргваякол (CG-4) в желчи ельца.

la. Глюкуронид CG-4, найденный в желчи рыбы, экспонированной в растворе CG-4. **lb.** CG-4 в желчи после обработки ее β -глюкуронидазой. **lc.** Желчь контрольной рыбы.

Хроматограф: Милихром-1.

Колонка: \varnothing 2x64 мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (50:50:0.1).

Элюент В: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CF}_3\text{COOH}$ (90:10:0.1).

Градиент: 0→100% В 23 мин. $F=0.1$ мл/мин. T : комнатная.

Образцы: растворы желчи в воде по 2 мкл (50 мг/мл).

Эксперимент. Экспериментального ельца не кормили 72 часа, а затем выдерживали 48 ч в аквариуме емкостью 20 л при 6-8°C в воде, содержащей 80 мкг/л CG-4. Концентрация конъюгата CG-4 в желчи рыбы в пересчете на CG-4 достигала 10-20 мг/мл.

По гидролизуемости образующегося конъюгата β -глюкуронидазой мы совместно с А.Ойкарй и др. (1988) впервые доказали, что он является именно глюкуронидом. KA для CG-4 в этом эксперименте составил 264000 (рис. 30).

Апробацию метода определения суммы ХФ проводили совместно с С.В.Надобновым и др. (1990) летом 1990 г. на Усть-Илимском водохранилище, куда по *р. Вихорева* сбрасывает свои стоки Братский ЦБК (рис. 31 и 32).

Сумму ХФ вычисляли по площади S210 участка хроматограммы, ограниченной на рис. 32 пунктирной линией. Эта область соответствует удерживанию всех ХФ, включая самый гидрофобный из них - пентахлорфенол. Для количественной оценки важно, что независимо от числа атомов хлора, ХФ имеют близкие коэффициенты весовой экстинкции при $\lambda=210$ нм (рис. 29-III). Конечные результаты, приведенные в табл. 2, рассчитаны для $KA=100000$.



Рис. 31. Схема расположения экспериментальных станций на Усть-Илимском водохранилище.

Плотву *Rutilus rutilus* экспонировали в садках из сетки с мелкой ячейкой. Желчь отбирали у 3-х рыб через 4, 8, 12 и 53 суток. К 50 мг желчи добавляли 10 мкл 10 М КОН, выдерживали 1 ч при 80°C, добавляли 200 мкл 10% CF₃COOH, экстрагировали хлорфенолы 500 мкл гексана, 250 мкл экстракта упаривали досуха, растворяли остаток в 20 мкл 0.1% CF₃COOH в CH₃OH и 4 мкл раствора анализировали. Результаты в табл. 2.

На схеме: БЦБК - Братский целлюлозно-бумажный комбинат; станции обозначены цифрами.

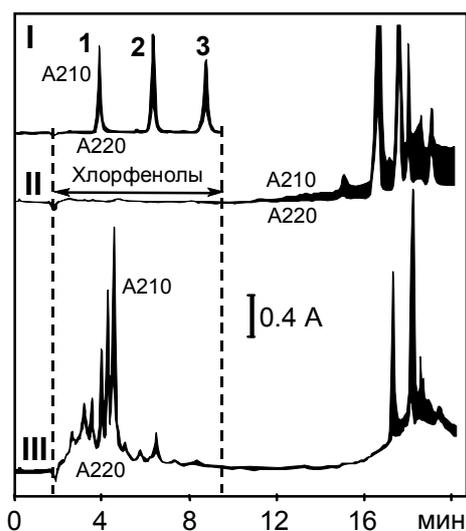


Рис. 32. Аккумуляция хлорфенолов в желчи плотвы *Rutilus rutilus*.

- I. Наиболее гидрофобные хлорфенолы (1- 4,5,6-трихлор-гваякол; 2- тетрахлоргваякол; 3- пентахлорфенол).
- II. Щелочной гидролизат желчи контрольной рыбы.
- III. Щелочной гидролизат желчи плотвы, экспонированной 4 суток на станции 1 (см. схему 1).

Хроматограф: Милихром-1.

Колонка: Ø2x64 мм; Nucleosil 100-5-C18.

Элюент А: CH₃OH - H₂O - CF₃COOH (50:50:0.1).

Элюент В: CH₃OH - CF₃COOH (90:10:0.1).

Градиент: 0→100% В 22 мин.

F=0.1 мл/мин. P=3 МПа. T: комнатная.

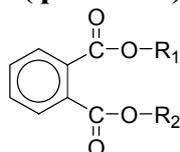
Образцы: по 4 мкл метанольных растворов.

Таблица 2. Сумма ХФ в воде Усть-Илимского водохранилища, мкг/л.

Экспозиция, дни	Станции:						
	1	2	3	4	5	6	0
4	75±19	62±16	43±11	151±38	550±138	184±46	<5
8	74±19	178±45	61±15	200±50	304±76	145±36	<5
12	87±22	57±14	58±15	164±41	170±43	106±27	<5
53	54±14	68±17	38±10	-	55±14	33±8	<5

Разработанный метод определения суммы ХФ в природных водах весьма прост, позволяет быстро обследовать большие и удаленные акватории, может быть использован для целей химического мониторинга. Мы считаем целесообразным ввести его в практику по аналогии с принятым в ряде стран интегральным показателем "общий органический хлор" (ТОСІ).

Диэфиры фталевой кислоты (фталаты):



представляют собой большую группу веществ (более 20), которые применяются в виде пластификаторов пластмасс и пестицидов. Они весьма устойчивы в

окружающей среде и накапливаются в жировых тканях водных организмов по пищевым цепям. В чистых районах содержание фталатов в воде составляет 0.1-1 мкг/л. Для разных организмов *КА* варьирует от 10-20 до 10000-50000. Он тем выше, чем дальше по пищевой цепи находится организм.

Совместно с Е.Д.Кирюхиной мы разработали метод определения суммы фталатов в жире байкальского тюленя - высшего водного организма в озере Байкал (рис. 33).

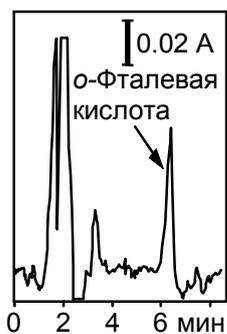


Рис. 33. Определение суммы фталатов в жире тюленя.

Хроматограф: Милихром-1. **Колонка:** $\varnothing 2 \times 64$ мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент: $\text{CH}_3\text{CN} - 0.01 \text{ M } (\text{H}-\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NH}_2\text{PO}_4$, pH 3.0 (30:70).

F=0.1 мл/мин. **P**=2 МПа. **T**: комнатная. $\lambda=210$ нм.

Образец: 2 мкл гидролизата жира после твердофазной экстракции.

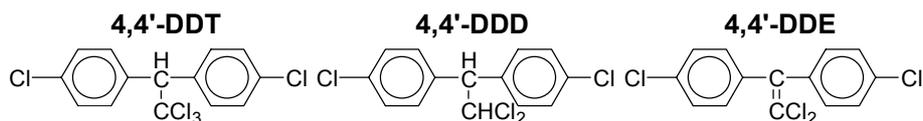
Подготовка образца: жир тюленя (самец, 15 лет, март 1993 г.) гидролизовали 1 час в 0.3 М КОН при 70°C. Гидролизат нейтрализовали H_3PO_4 . Жирные кислоты удаляли твердофазной экстракцией на BAKERBOND spe* C18 (3 мл). Содержание *o*-фталевой кислоты составило 0.1 мг/г.

Содержание фталевой кислоты в щелочном гидролизате жира составило 100 мг/кг, но эта величина не может быть прямо использована для вычисления *КА*, так как возраст животного был 15 лет, а мы не знаем ни скорость поступления фталатов в жир, ни скорость их выведения. Если принять, что равновесие "фталаты в воде \leftrightarrow фталаты в жире" устанавливается быстро, то, зная, что концентрация в байкальской воде главного представителя группы фталатов - *бис*(2-этилгексил)-фталата - равна ≈ 1 мкг/л, получим $\text{КА} \approx 100000$.

О том, что мониторинг фталатов представляется для озера Байкал важным, говорит оценка общего содержания фталатов в водной толще. При их концентрации в воде $\approx 10^{-9}$ кг/л и объеме Байкала, равном $\approx 2 \cdot 10^{16}$ л, общее количество фталатов составит $\approx 2 \cdot 10^7$ кг или 20000 т. Содержание фталатов для всего стада байкальских тюленей (≈ 100000 голов), считая, что один тюлень содержит ≈ 20 кг жира с концентрацией фталатов $\approx 10^{-4}$ кг/кг, составит более скромную, но тоже заметную цифру ≈ 200 кг.

Высокое содержание фталатов в жире нерпы обращает на себя внимание еще в связи с тем, что местные жители часто применяют жир в лечебных целях.

DDT и его метаболиты DDD и DDE:



содержатся в воде озера Байкале в заметных количествах. Подобно фталатам, они накапливаются по пищевой цепи в жире тюленя и находятся в нем в свободном состоянии. Так как эта группа состоит всего из трех веществ, все они найдены отдельно (рис. 34).

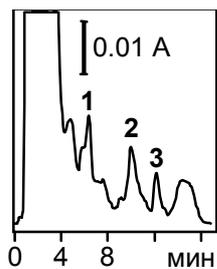


Рис. 34. DDT и его метаболиты в жире байкальской нерпы.

Хроматограф: Милихром А-02 (макет).

Колонка: $\varnothing 2 \times 64$ мм; Eurosphere 80-5 C18.

Элюент: $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (80:20). $F=0.2$ мл/мин. $P=3$ МПа. $T=45^\circ\text{C}$. $\lambda=240$ нм.

Образец: 4 мкл метанольного раствора экстракта жира байкальской нерпы (самец, 1 год, апрель 1993 г.). Содержание пестицидов в 1 г жира составило:

1. 4,4'-DDD - 4.0 мкг; 2. 4,4'-DDT - 4.5 мкг; 3. 4,4'-DDE - 3.0 мкг.

Подготовка образца: 47 мг жира наносили на сухую колонку для твердофазной экстракции BAKERBOND spe C18 (3 мл), затем наносили 50 мкл тетрагидрофурана и высушивали колонку досуха, присоединив ее к вакуумной линии. Пестициды элюировали 2 мл ацетонитрила. Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в 50 мкл метанола и раствор анализировали.

Полученное количество ΣDDT в жире близко по величине к известным данным (J.Kucklik, 1996). Так как концентрация ΣDDT в байкальской воде равна примерно 0.1 нг/л (J.Kucklik, 1992), то для тюленя $KA \approx 10^8$. Количество ΣDDT в водном теле Байкала составляет ≈ 2000 кг, а во всем стаде тюленей содержится ≈ 20 кг DDT и его метаболитов.

2.3.4. Определение веществ-трассеров в окружающей среде

Важной проблемой охраны окружающей среды является картирование загрязненных территорий и выявление источников эмиссии загрязнителей. В данном случае загрязнители выступают в роли химических трассеров, и информация об их перемещении в окружающей среде может быть использована для изучения различных процессов (перенос воздушных масс, водные течения и пр.). В ходе этих исследований постоянно возникают балансовые задачи, требующие учета распределение загрязнителя между пограничными областями "атмосфера/водная поверхность", "атмосфера/почва", "вода/дно" и т.д. Очевидно, что применяемый метод анализа должен быть адаптирован ко всем этим объектам.

Типичными многоцелевыми химическими трассерами являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), попадающие в окружающую среду из дымовых труб угольных котельных, автомобильных выхлопных газов, выбросов алюминиевых производств и пр. Для изучения их распространения мы совместно с А.Г.Горшковым разработали необходимые методики определения "главных" ПАУ в различных водах, в почве, в донных осадках, в атмосферном аэрозоле. Они включали процедуру отбора и подготовки образца, экстракцию ПАУ органическим растворителем (гексан, циклогексан или хлористый метилен) и их разделение методом МК ВЭЖХ на обращенной фазе Nucleosil 100-5 C18 PAH ("Macherey-Nagel", ФРГ) (рис. 35).

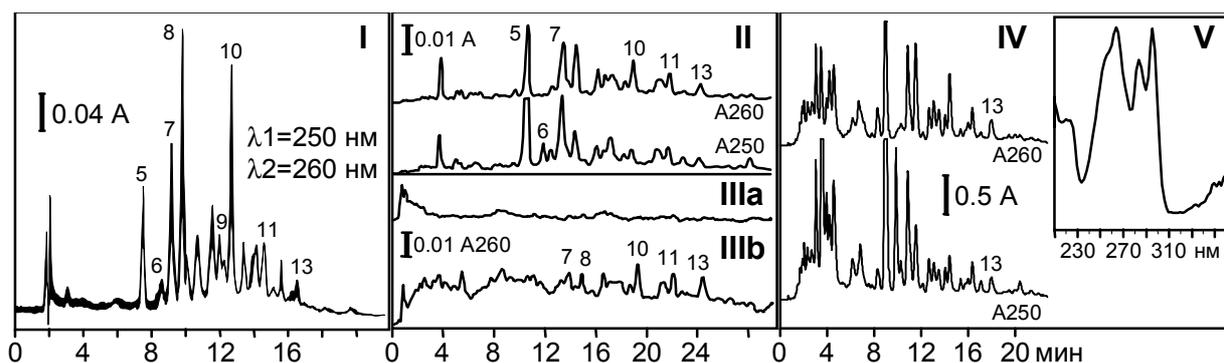


Рис. 35. Определение ПАУ в объектах окружающей среды.

I. Экстракт 100 г почвы (г.Юлих, ФРГ, 1991 г); экстрагент - CH_2Cl_2 . **II.** Гексановый экстракт 1 л снежной воды (г.Слюдянка, зима 1994 г). **III-** Гексановая вытяжка из аэрозольных 2 мкм фильтров; прокачивали 27 м³ воздуха; зима 1994 г.: **IIIa-** г.Байкальск; **IIIb-** г.Слюдянка. **IV.** Экстракт 1 л сточной воды алюминиевого завода (г.Шелехов, 20 июня 1996 г.). **V.** УФ-спектр пика 13 (бензо(а)пирен).

Хроматографы: **I-** Милихром-1 с двухшприцевым градиентным насосом; **II, III-** Милихром А-02 (макет); **IV-** Милихром А-02. **Колонки:** **I-** $\varnothing 2 \times 80$ мм; **II-IV-** $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18 PAH. **Элюенты А:** **I-** MeOH-H₂O (80:20); **II-IV-** MeOH-H₂O (65:35). **В:** **I-** MeCN; **II-IV-** MeCN-H₂O (85:15). **Градиенты:** **I-** 0→100% В 9 мин, 100% В 13 мин; **II и III-** 0% В 3.3 мин, 0→100% В 30 мин; **IV-** 0% В 2.5 мин, 0→100% В 18 мин, 100% В 3 мин. **F:** **I-** 0.12; **II и III-** 0.15; **IV-** 0.2 мл/мин. **T:** **I-** 22; **II и III-** 40; **IV-** 45°C. **Предобразец:** 5 мкл воды. **Образцы:** растворы в метаноле: **I и IV-** по 5 мкл; **II и III-** по 2 мкл.

Для надежной идентификации пиков детектирование во всех случаях проводили при двух или трех длинах волн. При высокой концентрации веществ дополнительную идентификацию осуществляли по УФ-спектрам, записываемым после остановки потока (рис. 35-V). Все методики обеспечивают чувствительность анализа ниже уровня установленных норм и могут быть использованы контролирующими лабораториями органов охраны природы. Результаты исследований, приведенных на рис. 35, суммированы в табл. 3.

Таблица 3. Содержание ПАУ в различных образцах (рис. 36).

№ пика	Название вещества	I мкг/кг	II мкг/л	IIIb нг/м ³	IIIa нг/м ³	IV мкг/л
5.	Фенантрен	36.4	2.7	<2	<2	
6.	Антрацен	<1	0.3	<0.05	<0.05	
7.	Флуорантен	120	5.9	20.1	<2	
8.	Пирен	70.0	<1.5	14.8	<1.5	
9.	Бенз(а)антрацен	38.4	-	-	-	
10.	Хризен	65.6	1.0	9.9	<1	
11.	Бензо(б)флуорантен	28.8	0.8	10.4	<1	
13.	Бензо(а)пирен	12.6	0.8	21.8	<1	0.88

Другими известными химическими трассерами являются анионы сульфат и нитрат, которые выбрасываются в заметных количествах в атмосферу при сжигании угля. Определяя их количество в атмосферном аэрозоле на разном удалении от трубы, можно получить представление о факеле распространения выбросов. Обычно, при решении таких задач широко используют метод ионной хроматографии. Совместно с М.В.Козловым и А.Л.Верещагиным мы разработали несколько вариантов анализа анионов, выполняемые на

хроматографах "Милихром". По своей сути они относятся к одноколоночной ионной хроматографии с непрямой фотометрической детекцией. Один из них показан на рис. 36. В этом случае разделение проводили на колонке с обращенной фазой, динамически модифицированной гидрофобным четвертичным амином. "Проявляющим" по УФ-поглощению анионом в элюенте был фталат.

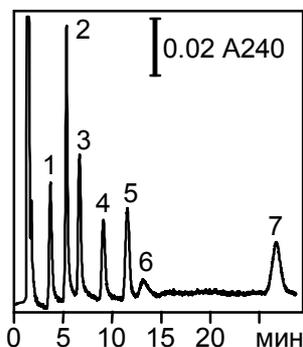


Рис. 36. Разделение неорганических анионов с применением непрямого фотометрического детектирования.

По 10 мг/л каждого аниона:

1- HCO_3^- . 2. Cl^- . 3. NO_2^- . 4. Br^- . 5. NO_3^- . 6. HPO_4^{2-} . 7. SO_4^{2-} .

Хроматограф: Милихром 4. полярность самописца обратная.
Колонка: $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18, динамически модифицированный бромидом триметилотдадециламмония.
Элюент: $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O} - 16$ мМ фталат натрия, pH 8.9 (10:80:10).
F=0.1 мл/мин. **T=35**°C. **Образец:** 10 мкл водного раствора солей Na.

Предел чувствительности методики по сульфату ≈ 0.05 мг/л, что характерно и для одноколоночных ионных хроматографов, снабженных кондуктометрическим детектором. Такая чувствительность достаточна для прямого определения фоновых концентраций сульфата в снежном покрове, не говоря об определении анионов в природных водах. Методика метрологически аттестована и внесена в Государственный реестр (МИ 2404-97).

Химические трассеры антропогенного происхождения используются и при изучении масштабных процессов водообмена. Так R.Weiss и др. (1991) исследовали вертикальные профили концентрации фреона, попадающего в Байкал из атмосферы в результате глобального переноса. По этим данным, учитывая известные для Байкала механизмы обмена поверхностных и глубинных вод и оценив количество ежегодно попадавшего в озеро фреона из данных о мировом производстве фреонов, они определили время обновления глубинных вод как ≈ 8 лет. Однако, фреоны как химические трассеры из-за их очень низкой концентрации в воде (≈ 0.001 мкг/л), очевидно, мало перспективны для рутинной практики.

В 1996 г. мы получили вертикальные профили концентрации ди(2-этилгексил)фталата (ДЭГФ) - кандидата в трассеры, содержание которого в байкальской воде было примерно в 1000 раз выше. Результаты говорили о явной неоднородности водного тела (рис. 38). Для Северного Байкала вертикальный профиль был весьма похож на те, что получил R.Weiss, но в остальном вопросов оказалось больше, чем ответов и исследование требует продолжения.

ДЭГФ в байкальской воде определяли на "Милихроме А-02" непосредственно на борту исследовательского судна "Титов". Необходимость этого была продиктована тем, что при хранении образцов более 12 часов концентрация ДЭГФ в них заметно либо уменьшалась, либо возрастала. Мы

объяснили такой эффект следующим образом. Известно, что ДЭГФ, являясь глобальным загрязнителем, присутствует в заметных количествах даже в дистиллированной воде и отмыть от него лабораторную посуду весьма трудно. Но если этого все-таки добиться щелочной обработкой стекла или прогревом посуды до 400°C, то поверхность стекла активируется и адсорбирует ДЭГФ из воды. Рекомендуемое в таких случаях добавление 2-5% изопропанола надежного результата не дало.

Концентрирование ДЭГФ из воды проводили прямо на колонке хроматографа, последовательно прокачивая через нее 5 раз по 2 мл воды насосом А. Воду предварительно насыщали гелием, но не фильтровали, избегая ее загрязнения. Через 15-20 разделений входной фильтр колонки приходилось менять.

Типичная хроматограмма ДЭГФ приведена на рис. 37-III. Идентификацию пика делали методом добавки. Детектирование проводили при длине волны 200 нм, соответствующей максимуму поглощения в спектре (рис. 37-I). Условия хроматографирования обеспечивали надежное отделение ДЭГФ от ближайшего гомолога - ди-*n*-октилфталата (рис. 37-II), который находят в природных водах, но в существенно меньших концентрациях.

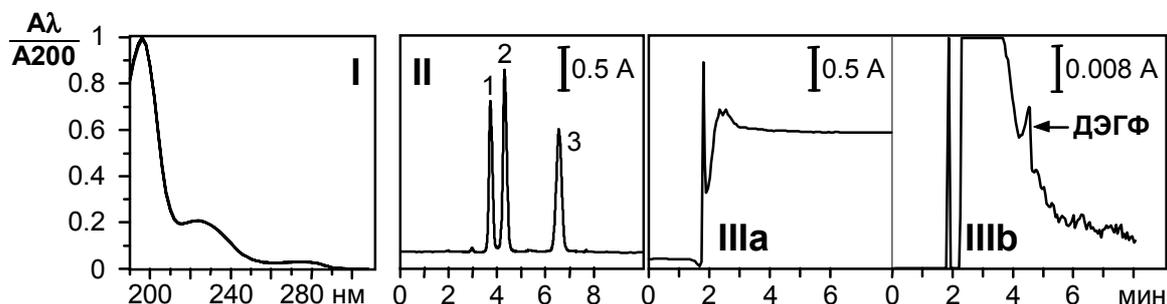


Рис. 37. УФ-спектр ди(2-этилгексил)фталата (ДЭГФ), разделение трех фталатов-гомологов и пример определения ДЭГФ в байкальской воде.

I. Нормированный УФ-спектр ДЭГФ, записанный после остановки потока вблизи вершины пика.

II. По 1 мкг фталатов: ДЭГФ (1); ди-*n*-октилфталат (2); ди-*n*-нонилфталат (3).

III. ДЭГФ в воде Северного Байкала; сент. 1996 г.; глубина 600 м, [ДЭГФ]=0.65 мкг/л.

Хроматограф: Милихром А-02. **Колонка:** Ø2x75 мм, Nucleosil 100-5 C18.

Элюент: CH₃CN - H₂O (90:10). **F**=0.2 мл/мин. **P**= 3.5 МПа. **T**=50°C. **λ**=200 нм.

Образцы: II- 2 мкл метанольного раствора фталатов (по 500 мг/л каждого). III- 10 мл воды.



Рис. 38. Вертикальные профили концентрации ди(2-этилгексил)фталата в трех котловинах Байкала (сентябрь, 1996 г.).

2.4. Применение МК ВЭЖХ для контроля качества питьевой воды

В связи с быстрым ростом глобального загрязнения окружающей среды и появлением большого числа новых экотоксикантов, требования к контролю качества питьевой воды в развитых странах в последние годы значительно ужесточаются. Значительное увеличение количества контролируемых веществ делает рутинный анализ весьма трудоемким и, в итоге, дорогостоящим, особенно когда такой анализ предполагает применение большого набора методов. Выход из создавшегося положения видится во внедрении максимально универсальных методов, каким является ВЭЖХ.

Наш опыт в области МК ВЭЖХ говорит о том, что это реально. Практически все методики анализа, приведенные в разделе 2.3. могут быть использованы для контроля качества питьевой воды как по чувствительности, так и по разрешению анализируемых веществ. В дополнение к ним приведем еще три, разработанные специально для этих целей.

Первая из них (рис. 39) разработана совместно с Г.А.Федоровой и предназначена для определения ацетальдегида в питьевой воде, расфасованной в бутылки из полиэтилентерефталата, который способен выделять некоторое количество ацетальдегида при термической формовке бутылки. Методика аттестована и внесена в Государственный реестр (МИ 2405-97).

Вторая методика (рис. 40) предназначена для определения УФ-поглощающих веществ в воде, прошедшей очистку на ионообменниках. Хотя эти вещества не идентифицированы, тем не менее их присутствие можно использовать для получения сигнальной информации при контроле работы очистных установок данных типов.

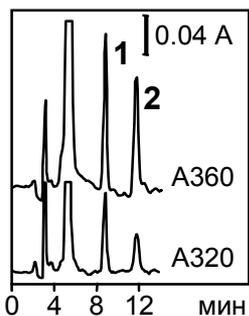


Рис. 39. Определение формальдегида и ацетальдегида в воде в виде 2,4-динитрофенилгидразонов.

Содержание альдегидов в анализируемой воде составило:
1- формальдегид - 30 мкг/л; 2- ацетальдегид - 70 мкг/л.

Хроматограф: Милихром А-02. **Колонка:** Ø2x64 мм, Nucleosil 100-5 С18.

Элюент: CH₃CN - 0.05 М К₂НРО₄, рН 6.5 (45:55).

F=0.1 мл/мин. **P**=2 МПа. **T**: комнатная.

Образец: 100 мкл нейтрализованной реакционной смеси.

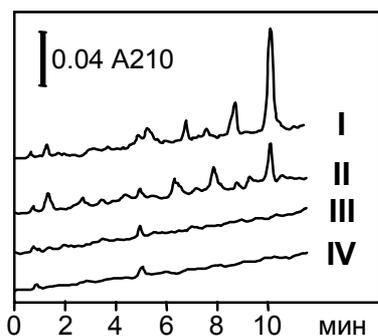


Рис. 40. Контроль качества очистки воды по присутствию УФ-поглощающих веществ.

I. Вода, очищенная по электроионообменной мембранной технологии. II. Деионизованная вода (фирма ELGA, Великобритания). III. Бидистиллированная вода. IV. Контроль.

Хроматограф: Обь-4. **Колонка:** Ø2x64 мм, Nucleosil 100-5 С18.

Элюент А: бидистиллированная вода. **Элюент В:** CH₃CN.

Градиент: 0→100% В 10 мин. **F**=0.2 мл/мин. **P**=4.5 МПа.

Образцы: I, II и III- по 2 мл; IV- 0 мл.

Третья методика (рис. 41), разработанная совместно с О.Ю.Глызиной и Н.Ю.Кузьминой, может быть использована для оценки концентрации фитопланктона в воде открытых водоемов на водозаборных станциях по содержанию хлорофиллов *a* и *b* экстрактах фильтратов. Такой метод контроля принят, например, во Франции. Кроме общего количества клеток в воде, соотношение хлорофиллов *a* и *b* дает ценные сведения о видовом составе фитопланктона, включая микропланктон (рис. 41-V). В отличие от известных методик определения фитопигментов, использующих детектирование в видимой части спектра, мы детектировали их при 330-360 нм. Потеря чувствительности в 2-3 раза в таких исследованиях не существенна. Отметим, что данная методика может быть весьма полезна и для биологического мониторинга водоемов.

2.5. Контроль фармацевтических препаратов методом МК ВЭЖХ

Фармакопея, пожалуй, единственный раздел аналитической химии, где методу ВЭЖХ, фактически, альтернативы нет. Фармацевтический анализ решает три главные задачи: определение примесей в субстанциях, определение состава готовых лекарственных форм; определение подлинности препаратов. Первые две по современным требованиям Фармакопей ведущих стран должны обеспечивать весьма высокую точность и метод МК ВЭЖХ еще должен доказать свою применимость. Но, что касается третьего, самого массового анализа - определения подлинности - здесь МК ВЭЖХ в сочетании с многоволновой детекцией имеет большие перспективы, связанные с возможностью создания

компьютерной библиотеки данных по примеру библиотек масс-спектров. Наличие таких библиотек освободит химика-аналитика от необходимости каждый раз обращаться к коллекции контрольных веществ и выполнять анализ привычным методом "внешнего стандарта".

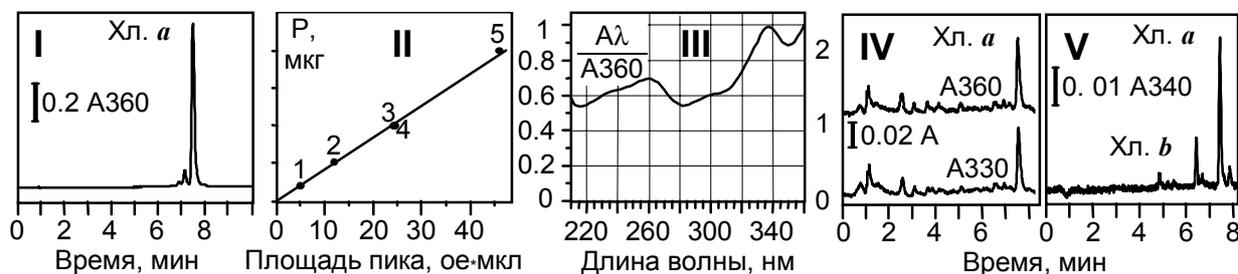


Рис. 41. Определение хлорофиллов *a* и *b* в фитопланктоне.

- I. Хлорофилл *a* в метаноле (100 мкг/мл). II- Калибровочный график по раствору I.
 III. Нормированный УФ-спектр хлорофилла *a*, записанный после остановки потока вблизи вершины пика: $A_{330}/A_{360}=0.91$; $A_{338}/A_{360}=0.98$; $A_{350}/A_{360}=0.88$.
 IV. Хлорофилл *a* (0.83 мкг в 1 л воды) в фитопланктоне Южного Байкала (июль, 1997 г.).
 V. Хлорофиллы *a* и *b* в культуре микропланктона.

Хроматограф: Милихром А-02. **Колонка:** $\varnothing 2 \times 75$ мм; Nucleosil 100-5 C18.

Элюент А: $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (90:10). **Элюент В:** CH_3OH . **Градиент:** 0→100% В 5 мин; 100% В 5 мин.

F: 0.2 мл/мин. **P:** 4.5 МПа. **T:** 45°C. **Детектор:** 330, 338, 350 и 360 нм; $\lambda=0.18$ сек.

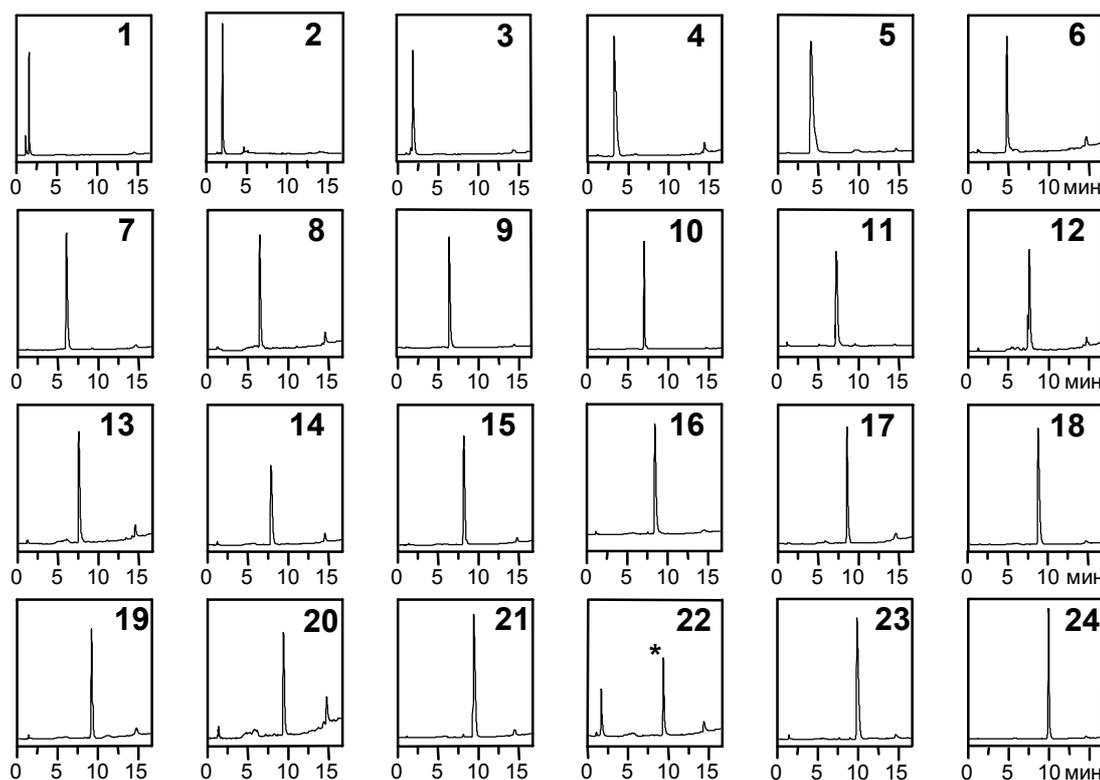
Образцы: I- 10 мкл. II- 2, 5, 10 и 20 мкл). IV- 40 мкл метанольного экстракта фитопланктона; 1 л поверхностной воды фильтровали через фильтр фирмы Whatman (GF/C, $\varnothing 25$ мм, 1.2 мкм) и разрушали клетки 4-5 мин ультразвуком в 1 мл метанольной суспензии. V- 5 мкл метанольного экстракта 65 мг сухой массы растущих на агар-агаре клеток (детекция при $\lambda=340$ нм).

О том, что обширная идентификационная библиотека может быть создана, свидетельствует разработанная нами совместно с Г.А.Федоровой и А.Л.Верещагиным методика определения более 60 лекарственных субстанций, часть из которых приведена на (рис. 42). Ее суть заключается в градиентном хроматографировании отдельно взятого вещества на хроматографе "Милихром А-02" с обращенно-фазной колонкой в строго стандартных условиях с детектированием при 4-8 длинах волн.

Предварительная идентификация осуществляется по времени удерживания. Здесь вероятность совпадения из-за большого числа соединений, конечно, велика, что уже видно на примере 24 соединений из табл. на рис. 42. Но если окончательную идентификацию проводить по 4-7 спектральным отношениям, вероятность полного совпадения всех 5-7 идентификационных признаков очень низка. В тех же редких случаях, когда это произойдет, потребуется провести арбитражный анализ в существенно других условиях и провести идентификацию по параллельной базе данных.

Конечная цель этой работы - "универсальная" методика анализа для очень большого числа отдельно определяемых соединений или их простых, например, содержащих 3-5 компонентов, смесей, каковыми являются лекарственные

формы. В связи с тем, что главную идентификацию проводят по спектральным отношениям, они должны измеряться с максимально высокой точностью и их значения не должны выходить за допустимые пределы по прошествии времени. Более того, они должны быть "правильными" в допустимых пределах для всех детекторов данной модели, независимо от времени их выпуска. В противном случае, полученная большими усилиями библиотека данных потребует частой корректировки, а это недопустимо.



№ и название препарата	T_r , мин	$R=A\lambda/A210$			№ и название препарата	T_r , мин	$R=A\lambda/A210$		
		220	254	280			220	254	280
1. Допегит	1.61	0.55	0.03	0.24	13. Фенциклидин	7.57	0.35	0.03	0.00
2. Морфин	1.94	0.59	0.04	0.06	14. Дикаин	7.84	0.96	0.14	1.52
3. Пентоксил	2.00	0.59	1.05	0.44	15. Димедрол	7.98	0.62	0.02	0.00
4. Эфедрин	3.27	0.13	0.02	0.00	16. Галоперидол	8.50	0.74	0.54	0.04
5. Клофелин	4.07	0.50	0.01	0.01	17. Бупренорфин	8.54	0.52	0.02	0.04
6. Новокаин	4.77	1.44	0.67	2.75	18. Пипольфен	8.56	0.49	1.35	0.09
7. Трамал	6.04	0.93	0.06	0.18	19. Ноксирон	9.06	0.25	0.02	0.00
8. Кокаин	6.45	2.23	0.44	0.30	20. Циклодол	9.23	0.29	0.03	0.00
9. Тримекаин	6.51	0.56	0.03	0.00	21. Метадон	9.47	0.47	0.02	0.02
10. Триоксазин	6.87	0.63	0.18	0.06	22. Тизерцин	9.48	0.86	0.93	0.08
11. Дроперидол	7.36	0.33	0.37	0.16	23. Аминазин	9.69	0.63	1.31	0.06
12. Промедол	7.53	0.22	0.02	0.00	24. Метаквалон	9.95	0.99	0.22	0.17

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5-C18. Элюент А: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/1 \text{ M } \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 3.0 (5:94:1). Элюент В: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5). Градиент: 0→100% В за 16.7 мин. $F=0.15$ мл/мин. $P=2.8$ МПа. $T=45^\circ\text{C}$. Детектор: 210, 220, 254 и 280 нм. Образцы: по 2 мкл раствора (0.5 мг/мл).

Рис. 42. Определение подлинности фармацевтических препаратов.

Специальные исследования детекторов хроматографов "Милихром" разных годов выпуска (Г.Г.Шамовский и др., 1994) показали, что уникальная технология производства гарантирует их "одинаковость" и позволяет использовать для указанной цели.

3. ВЫВОДЫ

1. Сделан обоснованный выбор масштаба ВЭЖХ, согласованный с масштабом типичного рутинного химического анализа. В соответствии с выбранным масштабом разработан метод микроколоночной ВЭЖХ на колонках длиной 60-80 мм и диаметром 2 мм, эффективность которых составляла 5000-6000 теоретических тарелок. Метод реализован в серийных хроматографах серии "Милихром".
2. В развитие метода МК ВЭЖХ разработана схема микроколоночного хроматографа с градиентным двухприцевым насосом. Характеристики насоса и элементов схемы выбирали и оптимизировали с учетом ограничений, связанных со сжимаемостью жидкости и экстраколоночным уширением, а также в соответствии с особенностями, заложенными в процедуру автоматического анализа. Схема реализована в серийно производимом хроматографе "Милихром А-02".
3. Исследована обращенно-фазовая микроколоночная хроматография пептидов. Получены количественные данные, позволяющие в зависимости от скорости потока, нагрузки и крутизны градиента прогнозировать эффективность разделения пептидов.
4. С помощью обращенно-фазной микроколоночной хроматографии решен ряд задач из области структурной химии белка:
 - разработаны методики разделения ФТК-, ФТГ- и ДНС-производных аминокислот, необходимые для структурных исследований пептидов на уровне 10^{-10} - 10^{-11} моля;
 - разработана методика микропрепаративной очистки трипсина от других протеаз с выходом активного белка не менее 90%; показана пригодность очищенного трипсина для получения "правильных" пептидных карт;
 - выделен в чистом виде аффинно модифицируемый пептид рибонуклеазы при ее реакции с алкилирующим производным динуклеотида;
 - получены в чистом виде триптические пептиды белка *E* оболочки вируса клещевого энцефалита;
 - из гипофиза телянка выделен в чистом виде пептид - лиганд бензодиазепинового рецептора;

- из гидролизатов миоглобина байкальского тюленя выделены в чистом виде пептиды, по первичной структуре которых была установлена полная аминокислотная последовательность белка;
 - разработана методика выделения чистых ДНС-пептидов из реакционной смеси для последующего неполного гидролиза и масс-спектрометрического определения первичной структуры.
5. С помощью микроколоночной ВЭЖХ решен ряд задач из области аналитической химии окружающей среды:
- разработаны методики разделения следующих контролируемых экотоксикантов: полициклические ароматические углеводороды; фенолы; хлорфенолы; пестициды (триазины, карбаматы, мочевины, хлорароматические кислоты и их эфиры, нейтральные хлорароматические инсектициды); взрывчатые нитросоединения; эфиры фталевой кислоты;
 - разработаны методики определения индивидуальных хлорфенолов и их глюкуронидов в желчи рыб, а также методика группового определения хлорфенолов в желчи рыб для оценки загрязнения водоемов хлорфенолами до суммарной их концентрации в воде около 5 мкг/л;
 - разработаны методики группового определения фталатов, а также DDT, DDD и DDE в жире байкальского тюленя, пригодные использования их для долговременного химического мониторинга озера Байкал;
 - разработаны методики определения полициклических ароматических углеводородов в воде, почве и атмосфере для картирования промышленных выбросов;
 - разработана методика определения главных неорганических анионов с непрямой фотометрической детекцией в природных водах и в атмосферном аэрозоле с пределом обнаружения сульфата не хуже 0.05 мг/л;
 - разработана методика прямого определения ди(2-этилгексил)фталата в байкальской воде для трассирования вертикального водообмена;
6. Для контроля качества питьевой воды разработаны методики определения ацетальдегида и формальдегида, хлорофиллов *a* и *b*, УФ-поглощающих веществ.
7. Разработан подход к использованию хроматографа "Милихром А-02" в качестве специализированного анализатора, предназначенного для определения подлинности фармацевтических препаратов.

4. Список основных публикаций по содержанию диссертации

1. Барам Г.И., Грачев М.А., Комарова Н.И. Некоторые области применения микроколоночного хроматографа "Обь-4". //Тез. докл. 2 Всесоюзн. симп. по жидк. хром., Черногоровка, 1982, С.95.
2. Baram G.I. Microcolumn HPLC. //In "Application of Biomedical Micromethods for the Investigation of Tropical Disease Pathogens". Ed. F.Michal. UNDP-WORLD BANK-WHO, Geneva, 1982, P.121-123.
3. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroizen M.P., Bolvanov Yu.A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V., Kuper E.A. Microcolumn liquid chromatography with multiwavelength photometric detection. I. The OB-4 micro-column liquid chromatograph. //J. Chromatogr., 1983, V.264, P.69-90.
4. Druganov A.G., Baram G.I., Raldugin V.A., Grachev M.A., Pentegova V.A. Analysis of gibberellins by microcolumn reversed-phase liquid chromatography with double-wavelength detection. //Abstr. of 10th Conference on isoprenoids. Lazne Trebon, CSSR, 1983, P.30-31.
5. Друганов А.Г., Барам Г.И., Ралдугин В.А., Грачев М.А., Пентегова В.А. Анализ гиббереллинов методом обратнофазовой жидкостной хроматографии с двухволновой детекцией. //Тез. докл. 1 Всесоюзн. конф. "Хроматография в биологии и медицине". Москва, 1983, С.53.
6. Барам Г.И., Болванов Ю.А., Грачев М.А., Каргальцев В.В., Комарова Н.И., Кузьмин С.В., Купер Э.А., Перельройзен М.П. Микроколоночная жидкостная хроматография с многоволновой фотометрической детекцией. Микроколоночный жидкостный хроматограф "Обь-4". Препринт. //ИЯФ СО АН СССР, Новосибирск, 1983, С.1-39. //ИГУ, Иркутск, 1989. С.1-39.
7. Друганов А.Г., Барам Г.И., Ралдугин В.А., Грачев М.А., Пентегова В.А. Анализ гиббереллинов методом жидкостной хроматографии. //В сб.: "Роль фитогормонов в проявлении некоторых признаков у растений". Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск, 1983, С.6-25.
8. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Павленко, В.А., Шкуров В.А., Барам Г.И., Грачев М.А., Кнорре В.Д., Куснер Ю.С. Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с масс-спектрометром. //Биоорг. химия, 1984, Т.10, №5, С.710-712.
9. Барам Г.И., Грачев М.А. Применение микроколоночной жидкостной хроматографии при исследовании рибонуклеазы методом аффинной химической модификации. //Тез. докл. III Всесоюзн. симпози. по молек. жидк. хромат. Рига, 1984. С.147-148.
10. Барам Г.И., Болванов Ю.А., Иутин В.С., Кузьмин С.В., Самушкин В.А. Микроколоночный жидкостный хроматограф "Обь-5". //Там же, С.163-164.
11. Кальюранд Э.Т., Вейссерик Ю.А., Болванов Ю.А., Барам Г.И. Автоматический дозатор для жидкостного хроматографа. А.с. №800869 СССР, 1984.
12. Кумарев В.П., Гилинский М.А., Барам Г.И. Выделение моноаминов мозга с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе. //Бюлл. эксперимент. биологии и медицины, 1985, №5, С.635-637.
13. Александров М.Л., Барам Г.И., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Николаев В.И., Шкуров В.А. Формирование пучков квазимолекулярных ионов пептидов из растворов. //Биоорг. химия, 1985, Т.11, №5, С.700-704.

14. Alexandrov M.L., Gall L.N., Krasnov N.V., Nikolaev V.I., Shkurov V.A., Baram G.I., Grachev M.A., Kusner Yu.S. Coupling of a liquid chromatograph with a mass spectrometer. //Abstr. of 10th Intern. mass spectrometry conference. Swansea, UK, 1985, No.37.
15. Baram G.I., Alexandrov M.L., Mirgorodskaya O.A., Grachev M.A. Some application of micro-column liquid chromatography and mass-spectrometry with direct inlet of liquids to protein chemistry. //Abstr. of V Danube symposium on chromatography. Yalta, 1985, P.45-46.
16. Perelroizen M.P., Zenkov A.P., Baram G.I. Micro-column liquid chromatography with multi-wavelength photometric detection. II. Computer treatment of time-share multi-wavelength detection data. //Там же, P.100-101.
17. Александров М.Л., Барам Г.И., Галль Л.Н., Грачев М.А., Кнорре В.Д., Краснов Н.В., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Николаев В.И., Шкуров В.А. Новый масс-спектрометрический метод для определения аминокислотной последовательности пептидов. //Биоорг. химия, 1985, Т.11, №5, С.705-708.
18. Барам Г.И., Грачев С.А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. //Биоорг. химия, 1985, Т.11, №10, С.1420-1422.
19. Барам Г.И., Грачев М.А., Назимов И.В., Плетнев А.Г., Прессман Е.К., Рубин С.Г., Сальников Я.В., Семашко И.В., Чумаков М.П., Шемякин В.В., Ямщиков В.Ф. Последовательность аминокислот некоторых триптических пептидов белка оболочки вируса клещевого энцефалита. //Биоорг. химия, 1985, Т.11, №12, С.1677-1679.
20. Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н. Множественная аффинная модификация РНКазы при алкилировании ее реакционноспособным аналогом 5'-дезоксирибонуклеотида. //Биоорг. химия, 1986, Т.12, №5, С.613-620.
21. Knorre D.G., Buneva V.N., Baram G.I., Godovikova T.S., Zarytova V.F. Dynamic aspects of affinity labelling as revealed by alkylation and phosphorylation of pancreatic ribonuclease with reactive deoxyribodinucleotide derivatives. //FEBS Letters, 1986, V.194, No.1, P.64-68.
22. Барам Г.И. Высокоэффективная микроколоночная обращенно-фазовая хроматография пептидов. //Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. по молек. жидк. хроматографии в Алма-Ате. Черногловка, 1987, С.263-265.
23. Брусков О.С., Яковлев А.Г., Плотников В.В., Барам Г.И., Грачев М.А., Кумарев В.П., Кудрякова Т.В., Боровков А.А., Кобзев В.Ф. Поиск эндогенных пептидных лигандов бензодиазепинового рецептора: выделение и молекулярно-генетические исследования. //Нейрохимия, 1987, Т.6, №1, С.43-51.
24. Шинкаренко В.Г., Комарова Н.И., Перельройзен М.П., Грачев М.А. Использование микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром". //НИИ Спец. техники МВД СССР, Москва, 1987, С.1-40.
25. Oikari A.O.J., Baram G.I., Grachev M.A., Evstafyev V.K. Determination and Characterization of Chloroguaicol Conjugates in Fish Bile by HPLC. //Environmental Pollution, 1988, V.55, P.79-87.
26. Грачев М.А., Артемова Н.Б., Барам Г.И., Надобнов С.В. Накопление хлорфенолов в рыбах приемных водоемов предприятий целлюлозной промышленности. //Докл. АН СССР, 1989, Т.309, №2. С.508-511.
27. Артемова Н.Б., Барам Г.И., Надобнов С.В. Применение метода ВЭЖХ для оценки загрязнения приемных водоемов предприятий целлюлозной промышленности хлорфенолами. //Тез. докл. Всесоюз. конф. "Применение хроматогр. на предприятиях химического комплекса". Пермь, 1989, С.155-156.

28. Барам Г.И., Куснер Ю.С., Миргородская О.А., Назимов И.В., Подтележников А.В. Проблемы проведения реакций с микроколичествами вещества. //Биоорган. химия, 1989, Т.15, №11, С.1462-1467.
29. Nadobnov S.V., Artemova N.B., Baram G.I. Determination of chlorophenols in fish bile by HPLC for estimation of pollution of water bodies with waste waters of pulp and industry. //Abstr. of the First Vereshchagin Baikal Intern. Conference. Irkutsk, 1989, P.70.
30. Malikov N.G., Baram G.I., Shemyakin V.V., Mirgorodskaya O.A., Nazimov I.V. The structure of myoglobin of Baikal seal *Phoca Sibirica*. //Там же, P.72.
31. Медведева С.А., Хуторянский В.А., Иванова С.З., Спиридонова Л.Н., Бабкин В.А., Барам Г.И. Анализ ароматических метаболитов - продуктов биодеструкции лигнина и моделирующих его соединений - с использованием ВЭЖХ. //Химия древесины, 1990, Т.3, С.72-75.
32. Барам Г.И., Федорова Г.А. Обращенно-фазная хроматография жирорастворимых витаминов с многоволновой детекцией. //Матер. Всесоюзн. конф. "Применение хроматогр. в пищевой, микробиол. и медиц. промышл. Геленджик, 8-12 окт." Москва, 1990, С.43-44.
33. Барам Г.И., Маринайте И.И., Надобнов С.В. Определение хлорфенолов в рыбе методом ВЭЖХ. //Там же, С.51-52.
34. Барам Г.И., Хуторянский В.А., Туркина Л.А., Горчакова О.В. Анализ компонентов чая методом ВЭЖХ. //Там же, С.67-70.
35. Барам Г., Хуторянский В.А., Кашина Н.Ф., Юревич В.П. Определение качества 6-аминопенициллановой кислоты методом ВЭЖХ. //Там же, С.75.
36. Барам Г.И., Кирюхина Е.Д., Кашина Н.Ф., Хуторянский В.А., Иванов Н.Ф., Юревич В.П. Анализ состава кормовой добавки "АСТОС" методом ВЭЖХ. //Там же, С.100-101.
37. Барам Г.И. Проблемы использования хроматографа "Милихром" для анализа объектов окружающей среды. //Тез. докл. 5 Всесоюзн. симпоз. по молек. жидкост. хроматогр. Рига, 1990, С.29.
38. Медведева С.А., Хуторянский В.А., Иванова С.З., Волчатова И.В., Бабкин В.А., Барам Г.И. Анализ ароматических метаболитов - продуктов биодеструкции лигнина - методом ВЭЖХ. //Там же, С. 55.
39. Барам Г.И., Маринайте И.И., Надобнов С.В. ВЭЖХ-анализ хлорфенолов в желчи рыб как тест на загрязнение водоема стоками предприятий целлюлозной промышленности. //Там же, С.222.
40. Барам Г.И., Федорова Г.А. Хроматографическое изучение свойств обращенных фаз. //Там же, С.238.
41. Барам Г.И., Грачев М.А., Маликов Н.Г., Назимов И.В., Шемякин В.В. Аминокислотная последовательность миоглобина байкальской нерпы. //Биоорган. химия, 1991, Т.17, № 9, С.1166-1171.
42. Ганенко Т.В., Горшков А.Г., Луцкий В.И., Барам Г.И., Семенов А.А. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с двухволновой фотометрической детекцией для анализа тритерпеновых гликозидов в растительном экстракте. //Жур. физ. химии, 1991, Т.65, №10, С.2863-2867.
43. Барам Г.И., Маринайте И.И., Надобнов С.В. Групповое определение хлорфенолов в желчи рыб как тест на загрязнение водоема стоками предприятий целлюлозной промышленности. //Жур. физ. химии, 1991, Т.65, №10, С.3369-3374.
44. Baram G.I., Marinayte I.I., Nadobnov S.V. The sum of chlorophenols accumulated in fish bile as an "integrated" value of water pollution: determination by HPLC. //Proceedings of

- 2nd Finnish-Russian Seminar: Chemistry and Ecology of Organo-Element Compounds. Ed. J.Paasivirta. Jyvaskyla. Finland, 1992, P.27-28.
45. Погодаева Н.Н., Трофимов В.Н., Горшков А.Г., Барам Г.И., Зайцев К.Л., Сырчина А.И., Семенов А.А. Количественное определение глицинбетаина в наземной части *Salsola Collina* P. Хим.-фарм. жур., 1992, № 9-10, С.94-96.
 46. Аврорин А.В., Аношин Г.Н., Барам Г.И., Грузнов В.М., Зайцев Н.К., Кобрина В.Н., Куценогий К.П., Моралев В.М., Морозов С.В., Стариченко В.Ф. Современные методы и приборы определения приоритетных токсикантов в природных средах и продуктах питания. Проблемы формирования сети базовых аналитических лабораторий. //В трудах Всеросс. конф. по эконом. развитию Сибири. Секция "Экология и здоровье". Ред. В.А.Коптюг. Новосибирск, 1993, С.19-43.
 47. Baram G.I. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Studies of Ecosystem of Lake Baikal. //Тез. докл. Международного симпоз. "Baikal as a natural laboratory for global change". Irkutsk, 1994, P.12.
 48. Fyodorova G.A., Baram G.I. HPLC-analysis of Acetaldehyde and Formaldehyde in Water. //Там же, P.30.
 49. Gorshkov A., Vodyannikova N., Bartz M., Khodzher T., Baram G. Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Micro-Column HPLC with Dualwavelength Photometric Detection. //Там же, P.31.
 50. Kiryukhina E.D., Baram G.I. HPLC-analysis of *o*-phthalate esters in different matrices. //Там же, P.46.
 51. Gorshkov A.G., Marinayte I.I., Baram G.I., Khodger T.V. Estimation of the level of pollution on the southern coast of Lake Baikal of polynuclear aromatic hydrocarbons. //Abstr. of 2 Vereshchagin Baikal Conference. Irkutsk, 1995, P.43.
 52. Baram G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. //J. of Chromatogr. A, 1996, V.728, No.1-2, P.387-399.
 53. Gorshkov A.G., Marinayte I.I., Obolkin V.A., Baram G.I., Khodger T.V. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the surface aerosol of the southern coast of lake Baikal. //Proceedings of Conference "Nucleation and Atmospheric Aerosol". Eds. M.Kulmala and P.E.Wagner. Helsinki, 1996, P.597-600.
 54. Baram G., Gorshkov G., Grachev M., Kiryuhina E., Lang B., Vereshchagin A. Di(2-ethylhexyl)phthalate in Lake Baikal. //Abstr. of Intern. Congress on Analyt. Chemistry. Moscow, 1997, V.1, E-105.

