

*На правах рукописи*



САПРЫКИНА Лидия Викторовна

**НОВЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ  
ВЫСОКОПОЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРАКТИКЕ ВЭЖХ**

Специальность: 05.11.11 – Хроматография и хроматографические приборы

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в лаборатории экологических разработок и аналитического контроля ОАО «НИПИгазпереработка».

**Научный руководитель:** доктор химических наук  
**Сердан Анхель Анхелевич**  
МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Официальные оппоненты:** доктор химических наук  
**Барам Григорий Иосифович**  
ЗАО Институт хроматографии «Эконова»

доктор химических наук  
**Ланин Сергей Николаевич**  
Химфак МГУ им. М.В. Ломоносова.

**Ведущая организация:** ЗАО «БиоХимМак СТ»

Защита диссертации состоится «**19**» **февраля** 2008 г. в **16 час. 00 мин.** на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.259.04 при ИФХЭ РАН по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 31, корп. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФХЭ РАН

Автореферат размещен на сайте Института: <http://phyche.ac.ru>

Отзывы на автореферат (заверенные печатью) просим высылать по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 31, корп.4, ИФХЭ РАН им. А.Н.Фрумкина, ученому секретарю Совета Д 002.259.04

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » января 2008 г.

Ученый секретарь Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций,

кандидат химических наук



Л.Н.Коломиец

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), интенсивно развиваясь несколько последних десятилетий, зарекомендовала себя в качестве одного из самых универсальных методов разделения и анализа веществ, что и обусловило ее необычайную популярность у исследователей в самых различных областях науки и техники.

Без использования ВЭЖХ сейчас невозможно представить практически ни одну отрасль промышленности. А динамичное развитие таких направлений как экология, здравоохранение, фармакология и токсикология в наибольшей мере обязано именно аналитическим приложениям жидкостной хроматографии.

В то же время, решая все более сложные аналитические и препаративные задачи, сам метод непрерывно развивается как в аппаратурном, так и в методическом плане.

Безусловно, в практическом плане для развития ВЭЖХ наиболее актуально появление новых хроматографических материалов, обладающих улучшенными разделительными характеристиками. Также весьма перспективны разработка и изучение новых методических приемов и режимов проведения хроматографического эксперимента. Особенно это значимо при разработке хроматографических методов разделения высокополярных веществ, в том числе - ионогенных. Необходимость анализа такого рода соединений в различных объектах появляется довольно часто при решении самых разнообразных научно-технических и технологических задач. Эти сорбаты являются традиционно сложными для разделения посредством классических режимов ВЭЖХ и предъявляют повышенные требования к качеству сорбентов и хроматографической аппаратуре.

Чаще всего используемые для осуществления таких анализов методические приемы, среди которых можно выделить реализацию ион-парного механизма разделения и предколоночную дериватизацию полярных компонентов пробы - далеко не всегда применимы.

Тем не менее, существует достаточно большое количество методов воздействия на хроматографическую систему, использующих динамическое

(адсорбционное) модифицирование (ДМ), применение которого позволяет получать хорошие результаты на морально устаревших и относительно дешевых сорбентах. К сожалению, среди многообразных приемов динамического модифицирования используются лишь некоторые, да и то неоправданно редко.

В последние годы все чаще стали появляться публикации с описанием разделений веществ в режиме гидрофильной хроматографии (так называемый HILIC-режим), который предусматривает применение в хроматографической практике немодифицированного силикагеля с полярными элюентами и значительно расширяет возможности ВЭЖХ.

Следует отметить, что применение этого весьма перспективного вида хроматографии также пока весьма ограничено, что обусловлено малой изученностью закономерностей процессов, протекающих на границе раздела фаз.

**Целью работы** являлась разработка и изучение новых видов воздействия на нормально-фазовые и обращенно-фазовые хроматографических системы в режиме динамического модифицирования и создание на этой основе методик анализа органических оснований в сложных аналитических объектах.

В соответствии с поставленной целью основными задачами работы являлись:

1. Выбор режимов работы на немодифицированных силикагелях с водно-органическими элюентами.
2. Изучение влияния на хроматографическое поведение полярных веществ добавок в элюент в качестве динамического модификатора значительного количества неорганических солей.
3. Разработка и экспериментальная проверка модели реализации режима с динамически индуцированным разделом фаз на примере разделения некоторых органических ионов.
4. Разработка методики ВЭЖХ анализа нативных бетаинов в биологических объектах.
5. Изучение возможности переноса некоторых приемов динамического модифицирования из ВЭЖХ в тонкослойную хроматографию (ТСХ).

**Научная новизна.** Изучены основные закономерности удерживания полярных соединений на немодифицированном силикагеле в водно-ацетонитрильных элюентах, содержащих неорганические соли.

Для объяснения этих закономерностей предложена и обоснована физическая модель раздела фаз у поверхности сорбента за счет высаливающего действия солей, присутствующих в элюенте в значительных концентрациях.

Рассмотрены перспективные варианты динамического модифицирования поверхности полярных сорбентов.

Впервые для анализа биологических проб разработан и успешно применен гетероповерхностный (РАМ) сорбент на основе силикагеля с немодифицированной поверхностью мезопор.

Изучена возможность и выявлены особенности динамического модифицирования сорбента в практике ТСХ хроматографии и показана перспективность такого подхода для изменения основного механизма сорбции.

**Практическая значимость работы.** Выявленные закономерности позволили разработать ряд новых приемов ВЭЖХ для анализа и препаративного разделения высокополярных соединений, потенциально востребованных в медицине, фармакологии, экологии и в аналитическом контроле промышленной продукции.

Разработана методика анализа четырех нативных бетаинов и лекарственного препарата с бетаиноподобной структурой в плазме крови.

**На защиту выносятся:**

- критерии подбора режимов работы на немодифицированных силикагелях с водно-органическими элюентами;
- некоторые закономерности влияния на хроматографические свойства системы добавок значительного количества неорганических солей в качестве динамического модификатора;
- физическая модель реализации режима с динамически индуцированным разделом фаз;
- методика ВЭЖХ анализа нативных бетаинов в биологических объектах;

–отдельные приемы динамического модифицирования в практике ТСХ.

**Публикации:** По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы докладывались на Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы». (г. Москва, 2004 г.); Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Применение в нефтехимии». (г. Самара, 2005 г.); X Международной конференции «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии», (г. Москва (Клязьма), 2006 г.); Всероссийском симпозиуме «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях, (г. Москва (Клязьма), 2007 г.)

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, четырех глав экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 167 страницах, содержит 12 рисунков, 8 таблиц и библиографию из 107 наименований.

Во введении обосновывается актуальность исследования, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна и практическая значимость работы, перечислены положения, выносимые на защиту.

Первая глава представляет собой обзор литературы, где отражены история появления и развития метода динамического модифицирования и основные методические приемы ВЭЖХ анализа полярных соединений. Рассмотрены современные подходы и примеры решения подобных задач.

Во второй главе дается описание объектов и методов исследования.

Третья глава посвящена обсуждению полученных результатов, выявлению и интерпретации закономерностей хроматографического поведения полярных сорбатов на динамически модифицированном силикагеле при использовании водосодержащих элюентов.

В четвертой главе представлены результаты проводимых экспериментов и обсуждение результатов, полученных с использованием нетрадиционных режимов динамического модифицирования в практике ТСХ.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В процессе развития ВЭЖХ так сложилось, что на практике наиболее широко применяется обращенно-фазовый режим элюирования на силикагелях с химически привитыми к их поверхности алкильными группами. Это обусловлено более широким набором возможностей разделения на таких сорбентах самых разноплановых по полярности и свойствам веществ.

Однако малая полярность поверхности таких сорбентов приводит к тому, что при анализе сильнополярных веществ последние практически не удерживаются в колонке даже при использовании слабых элюентов, органические основания обычно элюируются в виде асимметричных пиков, что, вероятней всего, связано с взаимодействием их с остаточными силанольными группами по ионообменному механизму.

Таким образом, без кардинального изменения свойств хроматографической системы добиться хорошего качества разделения подобных веществ достаточно сложно. Для достижения цели обычно используется динамическое модифицирование (ДМ). Его основное предназначение - улучшить результаты хроматографического разделения определенных классов сорбатов за счет существенной корректировки условий их сорбции.

Под динамическим модифицированием обычно понимают введение в состав элюента различных добавок, как правило – относительно низкомолекулярных, веществ, призванных целенаправленно изменить те или иные свойства сорбционной системы.

В таком более широком понимании ДМ предполагается, что модификации подвергается не только сорбент, а вся система «сорбат–элюент–сорбент» в целом.

При хроматографическом разделении полярных и ионогенных веществ в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ наиболее популярным методом динамического модифицирования является добавка в водно-органический элюент солей минеральных и/или органических кислот, а также буферных систем на их основе. Это зачастую позволяет уменьшить асимметрию пиков за счет подавления ионизации сорбатов.

Тем не менее, даже в форме, соответствующей максимальной липофильности, сильнополярные и ионогенные сорбаты очень плохо удерживаются в обращенно-фазовом режиме, а потому, наряду с использованием ион-парного режима, соли определенного строения добавляют еще и с целью увеличения удерживания таких соединений. Причиной увеличения удерживания, видимо, является совместное и однонаправленное действие нескольких факторов.

Во-первых, это увеличение ионной силы раствора, препятствующее диссоциации кислот и протонированию оснований, что увеличивает их липофильность.

Во-вторых, наличие неорганической соли значительно меняет условия сольватации, в частности, снижает степень гидратации молекул сорбата, что не может не сказаться на прочности водородных связей в ассоциатах полярных молекул и их липофильности.

Совокупность этих факторов приводит к высаливанию из водных растворов веществ, менее полярных, чем ионы соли, что существенно меняет коэффициент распределения анализируемого вещества в системе жидкостей "элюент–НЖФ". При этом, очевидно, приповерхностный слой элюента обедняется, а поверхность сорбента обогащается органическим компонентом элюента.

Кроме солей с буферными свойствами, например, фосфатов, для этих целей можно применять и нейтральные соли, такие как перхлораты, хлориды и сульфаты.

Рассмотрим наиболее вероятные процессы, происходящие с хроматографической системой в присутствии достаточно большого количества соли. В этом случае важную роль играет природа более неполярного растворителя в составе обращенно-фазового элюента.

Ацетонитрил и, например, метанол ведут себя в относительно концентрированных растворах неорганических солей по-разному. И в одном, и в другом случае при достижении некоторой предельной концентрации соли в элюенте начинается его гетерогенизация. И если в случае метанола, имеющего наибольшее из всех органических растворителей сродство к воде, происходит выпадение осадка избыточной соли, то ацетонитрил, наоборот, просто сам высаливается из элюента, всплывая на поверхность. При этом образуются две

жидкие несмешивающиеся фазы: нижняя, содержащая, в основном, воду и соль, и верхняя – водный раствор, предельно обогащенный ацетонитрилом и практически не содержащий гидратированных ионов соли. В табл. 1 приведены экспериментально найденные предельные концентрации ацетонитрила при фиксированных содержаниях дигидрофосфата калия, выше которых происходит гетерогенизация элюента.

Таблица 1. Максимальное (до гетерогенизации) содержание  $\text{CH}_3\text{CN}$  в элюенте в зависимости от концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  при  $20^\circ\text{C}$  и  $\text{pH}$  6,2.

Концентрация $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , М	Содержание ацетонитрила, об. %
0,01	95,8
0,05	84,3
0,10	75,4
0,20	66,0
0,25	58,7
0,30	53,1
0,50	40,0
0,70	35,7

Следует отметить, что, в зависимости от химической природы используемой соли, гетерогенизация элюента начинается при различных концентрациях ацетонитрила. Установлено также, что концентрационный порог расслоения элюента также существенно зависит от температуры и в значительно меньшей степени – от  $\text{pH}$  подвижной фазы.

Кроме ацетонитрила, такое поведение в смесях с водой характерно для многих других апротонных растворителей, в частности, для кетонов, сложных и простых эфиров.

Можно предположить, что примерно такое же расслоение происходит и на поверхности сорбента. В случае алкилсиликагелей и других неполярных фаз, образуется достаточно толстая пленка жидкости (рис. 1), состоящая из почти чистого ацетонитрила с небольшим содержанием воды, примерно соответствующая по составу азеотропу .

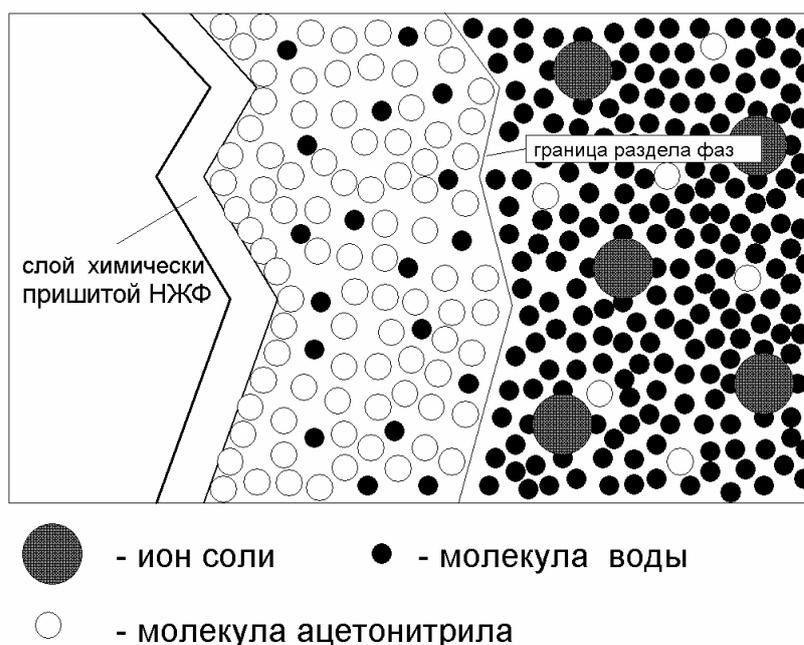


Рис. 1. Упрощенная схема формирования динамически индуцированного раздела фаз на поверхности октадецилсиликагеля.

Удерживание происходит преимущественно по распределительному механизму, а не по сольвофобному, как это было бы в отсутствие соли. Сорбат распределяется между двумя жидкими фазами: ацетонитрил и водно-ацетонитрильно-солевой раствор. Полярность ацетонитрила гораздо выше, чем у алкильной фазы, а потому растворимость полярных сорбатов в такой НЖФ значительно больше, что сказывается на константе распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами, а соответственно – и на его удерживании. Кроме того, значительно меньшая разница в полярности фаз способствует гораздо более быстрому установлению сорбционного равновесия и более интенсивному массообмену, а достаточно большая толщина неподвижной фазы обуславливает меньше стерических затруднений при сорбции, поскольку позволяет распределить в своем объеме относительно крупные молекулы сорбатов. Нельзя исключить и существование некоторой диффузионной области между фазово разделенными жидкостями, где концентрация ацетонитрила увеличивается постепенно по мере приближения к поверхности алкилсиликагеля. Однако образование такой области возможно лишь при сольватации ионов соли ацетонитрилом, но однозначных

экспериментальных подтверждений протекания такого рода процессов не получено.

Уже при содержании соли в элюенте, составляющем 70 – 80% от уровня его гетерогенизации, расслоение за счет капиллярного эффекта происходит на поверхности основных пор сорбента, а в мелких порах оно может начинаться еще при более низких концентрациях соли (порядка 60%).

Этот эффект можно наблюдать визуально, если поместить гомогенный элюент близкого к расслоению состава в кварцевый капилляр внутренним диаметром 0,1 мм.

Такой граничный режим динамического модифицирования хроматографической системы можно назвать «динамически индуцированным разделом фаз» (ДИРФ), поскольку реализуется вариант хроматографии на разделе фаз двух несмешивающихся жидкостей, образованном при взаимно опосредованном воздействии на поверхность сорбента компонентов элюента.

Следует отметить, что для осуществления индуцированного раздела фаз подойдут силикагели и с другими химически пришитыми фазами, такими как нитрил-, амин- или диол-. Соответственно хроматографические свойства таких систем будут несколько отличаться от аналогичных свойств хроматографических систем на основе октадецилсиликагеля за счет, например, специфических взаимодействий сорбата с пришитыми к силикагелю группами.

Весьма перспективно использование и обычных силикагелей совместно с элюентами на основе водно-органических смесей с солевыми добавками в элюент, типичными для обращенно-фазовой ВЭЖХ. Небезуспешные попытки разделения некоторых смесей сорбатов в таких системах делались еще с начала 80-х годов прошлого века. Известно также, что при работе с элюентами, содержащими значительные количества воды, на обычном силикагеле не удастся добиться приемлемого удерживания большинства сорбатов без добавления в элюент специальных динамических модификаторов.

Качественное разделение, например, становится возможным при добавке в элюент полиаминов, тетраалкиламмониевых солей и других катионогенных ПАВ, формирующих на силикагеле поверхность с определенными свойствами. Помимо

этого, добавка в элюент солей органических и неорганических кислот позволяет добиться аналогичного эффекта. Можно использовать, например, соли хлорной, фосфорной и муравьиной кислот. Двум последним отдают предпочтение, когда необходимо стабилизировать рН элюента за счет их буферных свойств.

Такая разновидность хроматографии активно используется в последние несколько лет и даже получила название - гидрофильная хроматография, в англоязычной хроматографической литературе больше известная как HILIC (Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography).

Этот режим позволяет хроматографировать высокополярные вещества преимущественно основного характера и используется чаще в системах ВЭЖХ-МС, когда применение ион-парных реагентов мешает работе масс-спектрометрического детектора.

Органические основания способны к довольно сильным взаимодействиям с силанольными группами силикагеля даже в водных растворах. Можно предположить, что благодаря кислому характеру силанольных групп, в данном варианте реализуется ионообменный режим сорбции. Добавки же небольших количеств солей приводят к ослаблению ионо-обменных взаимодействий за счет конкурирующего влияния катионов.

Можно предположить, что при работе на обычных силикагелях с использованием водосодержащих элюентов добавка более значительных количеств соли в элюент также приводит к динамически индуцированному разделу фаз, но у поверхности сорбента остается пленка жидкости, содержащая воду и гидратированные ионы соли в больших концентрациях, по сравнению с их концентрациями в элюенте (рис. 2).

Образуется пленка очень полярной НЖФ, состоящей из водного раствора соли, фазово отделенная от элюента, содержащего значительные количества ацетонитрила, а потому гораздо менее полярного. То есть, раздел фаз протекает по такой же схеме, что и на алкилсиликагеле, однако картина инвертирована. Режим разделения также остается нормально-фазовым, но все, что касается толщины пленки НЖФ и скорости установления межфазного концентрационного

равновесия, претерпевает те же изменения, как и в случае обращенно-фазового режима.

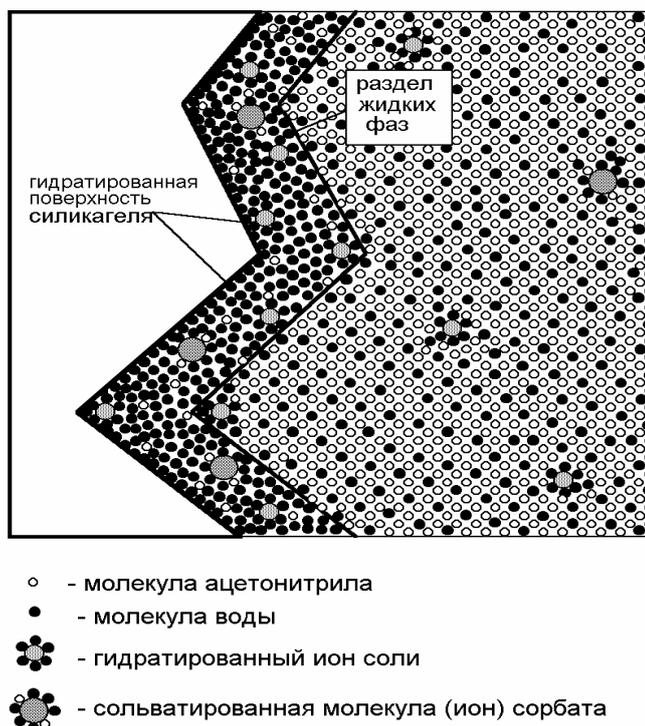


Рис. 2. Упрощенная схема формирования раздела фаз на поверхности силикагеля.

Этот вариант можно рассматривать как граничный режим гидрофильной хроматографии (ННЛС-режима).

В пользу образования на поверхности сорбента границы раздела двух фаз свидетельствует ряд экспериментально выявленных нами особенностей, присущих только этому режиму на силикагеле.

Симметричная форма пиков полярных соединений говорит о том, что изотерма адсорбции линейна, а это более характерно для распределительного механизма.

Уменьшение эффективности колонки, связанное, видимо, с увеличением толщины слоя НЖФ на поверхности сорбента, что, в свою очередь, затрудняет диффузию (ионов) сорбата через толщину пленки НЖФ до границы раздела фаз.

Аномально сильное влияние состава элюента на удерживание сорбатов. Фактор удерживания может измениться вдвое при изменении состава элюента всего на несколько процентов.

Удерживание сорбатов гораздо сильнее зависит от температуры колонки, чем в других вариантах ВЭЖХ.

Режим крайне чувствителен к структуре и размеру пор используемого силикагеля.

ДИРФ на обычном силикагеле имеет наибольшие потенциальные возможности, так как хорошо проявляет себя при разделении высокополярных веществ как кислого, так и основного характера, анализ которых традиционно сложен при использовании других режимов ВЭЖХ. Некоторое снижение эффективности колонки по отношению к этим соединениям, не представляется принципиальным, поскольку при других режимах ВЭЖХ эффективность снижается гораздо больше, в первую очередь, за счет мешающего ионного обмена.

В то же время липофильные сорбаты в этом режиме практически не удерживаются в колонке и выходят вблизи мертвого объема, что вполне логично и ожидаемо с точки зрения рассмотренного предполагаемого механизма сорбции. Это обстоятельство делает применение ДИРФ очень выгодным при анализе полярных сорбатов в биологических пробах, содержащих значительные количества жиров, липидов и аналогичных им липофильных соединений.

Потенциальные возможности ДИРФ наиболее наглядно проявляются при анализе веществ, практически не определяемых на нужном уровне и в сложных объектах при других режимах ВЭЖХ.

В таблице 2 представлены структуры 4 бетаинов и бетаиноподобного вещества – милдроната.

На примере этих и некоторых других очень полярных соединений можно увидеть некоторые закономерности и особенности проявления режима ДИРФ.

Только в нормально-фазовом варианте ДИРФ нам удалось, например, разделить четыре бетаина и лекарственное вещество "кардиопротектор" со структурой и свойствами, близкими к бетаинам, (рис. 3). В других условиях они практически не удерживаются в колонке даже при использовании ион-парного режима, а применение ионообменных сорбентов дает большое уширение пиков, не позволяющее достигнуть нужного уровня детектирования.

Таблица 2. Структура 4 бетаинов и бетаиноподобного вещества – милдроната, используемых для приготовления модельных смесей.

1	Глицинбетаин (N, N, N – триметиламиноацетат)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
2	$\beta$ -аланин - бетаин (3-(N, N, N – триметиламино)- пропионат)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
3	$\gamma$ -треонина-бетаин (карнитин) (N, N, N – триметиламино)-2- оксибутират	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array}$
4	$\gamma$ -аминомасляная кислота (4-(N, N, N – триметиламино)- бутират)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
5	Милдронат- (N, N, N – триметилгидразиний)- пропионат	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

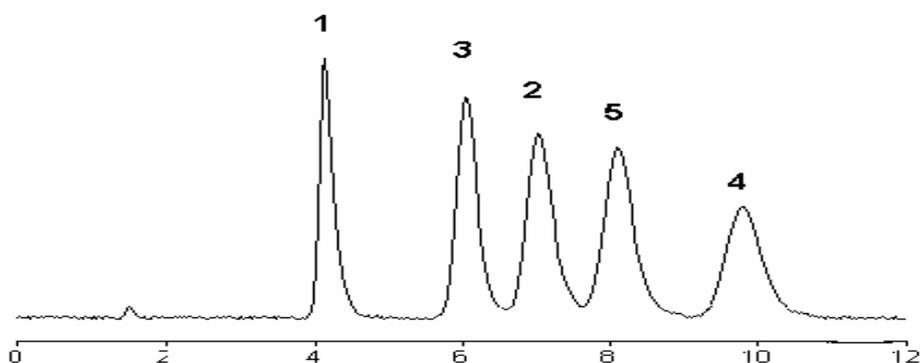


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси бетаинов.

Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 198 нм, колонка: 2x80 мм, заполнена Separon SGX 5 мкм; элюент: 70% ацетонитрила в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,2. 1– глицинбетаин, 2-  $\beta$ -аланин–бетаин, 3-  $\gamma$ -треонин-бетаин (карнитин), 4- бетаин  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, 5– милдронат (триметилгидразинийпропионат). Концентрация веществ в пробе – по 0,1 мг/ мл.

На рис. 4 показана зависимость фактора удерживания от концентрации ацетонитрила в элюенте для карнитина и молочной кислоты. Хорошо видно, что для сорбата кислого характера зависимость проще, и наблюдается лишь порог резкого увеличения удерживания, соответствующий, видимо, переходу хроматографической системы в режим ДИРФ. До этого момента удерживание данного сорбата очень слабо зависит от содержания ацетонитрила, проявляя лишь некоторую тенденцию к росту при увеличении его концентрации.

Для бетаина наблюдается локальный максимум малой интенсивности в интервале от 20 до 40 % ацетонитрила, который, вероятнее всего, соответствует удерживанию этого сорбата по ионообменному механизму на кислых силанольных группах за счет аммонийного азота. В пользу этого же предположения свидетельствует отсутствие подобного максимума для кислого сорбата.

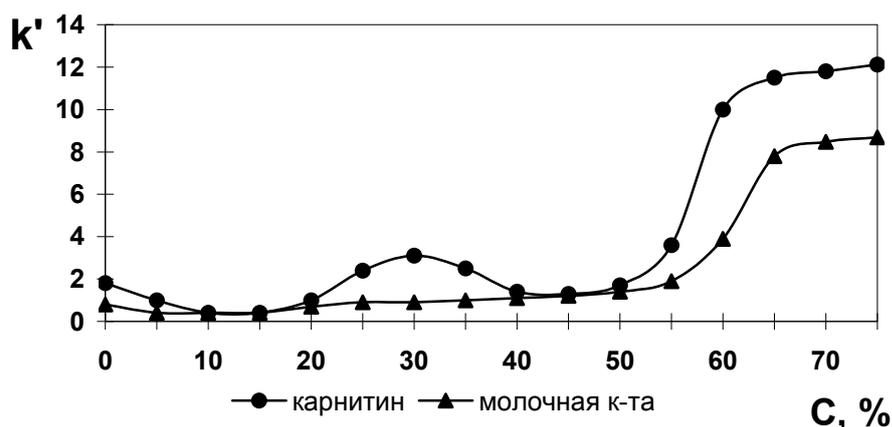


Рис. 4. Зависимость удерживания карнитина и молочной кислоты от концентрации ацетонитрила в элюенте с 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,4).

Этот интервал соответствует разделению оснований в режиме гидрофильной хроматографии, где достигаются вполне приемлемые для ВЭЖХ значения удерживания. Далее, как и для молочной кислоты, наблюдается резкое увеличение удерживания, обусловленное появлением раздела фаз на поверхности сорбента.

В области режима ДИРФ с ростом значения рН до 4 удерживание бетаинов также возрастает в среднем вдвое (рис. 5), что связано, очевидно, с образованием цвиттер-ионов, изменением характера сольватации и повышением полярности сорбатов. Именно из-за влияния рН на удерживание данных сорбатов, в качестве

соли и был выбран дигидрофосфат калия, обладающий рН буферной ёмкостью. При фиксированной концентрации ацетонитрила в элюенте и увеличении концентрации фосфатного буфера можно наблюдать постепенное увеличение удерживания сорбатов и уменьшение асимметрии пика (рис. 6). И в этом случае наблюдается заметное увеличение удерживания вблизи концентрации расслоения. Тем не менее, до этого момента также существует область концентраций фосфатного буфера, где достигаются вполне приемлемые значения факторов удерживания.

Коэффициент асимметрии пика в режиме ДИРФ, как правило, не превышает 1,3–1,4, а для некоторых полифункциональных сорбатов может принимать значения чуть менее единицы. Это обстоятельство позволило предположить, что в данном режиме даже следовые количества полярных веществ не будут подвержены необратимой сорбции в колонке.

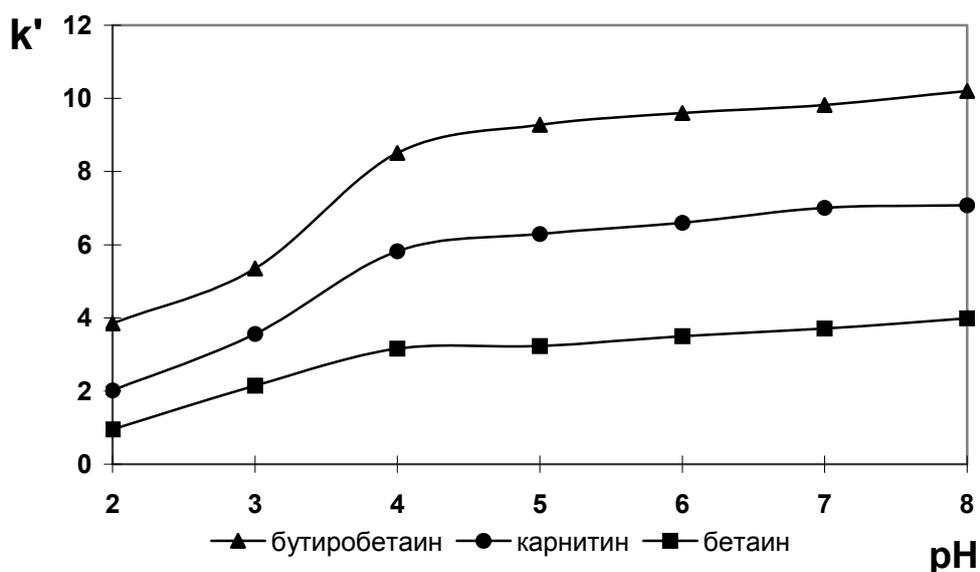


Рис. 5. Зависимость удерживания бетаинов от рН элюента.

Исходя из зависимостей величины факторов удерживания от состава элюента, очевиден вывод, что можно добиться примерно одинаковых параметров хроматографической системы при различных концентрациях ацетонитрила в элюенте, варьируя при этом лишь содержание дигидрофосфата калия. На практике же, для реализации режима ДИРФ с фосфатным буферным раствором наиболее удобно работать в интервале концентраций ацетонитрила от 50 до 80 %. При

меньшем его содержании в элюент приходится добавлять слишком большие количества соли, которая в этих условиях склонна к образованию пересыщенных растворов и при некоторых обстоятельствах может выпасть в осадок прямо в колонке. Более значительные концентрации ацетонитрила в элюенте также неудобны в работе, поскольку интервал приемлемых концентраций соли сужается, что затрудняет процедуру приготовления элюента. Кроме того, за счет снижения общей концентрации дигидрофосфата сильно падает буферная емкость элюента, и стабилизация значения рН затрудняется.

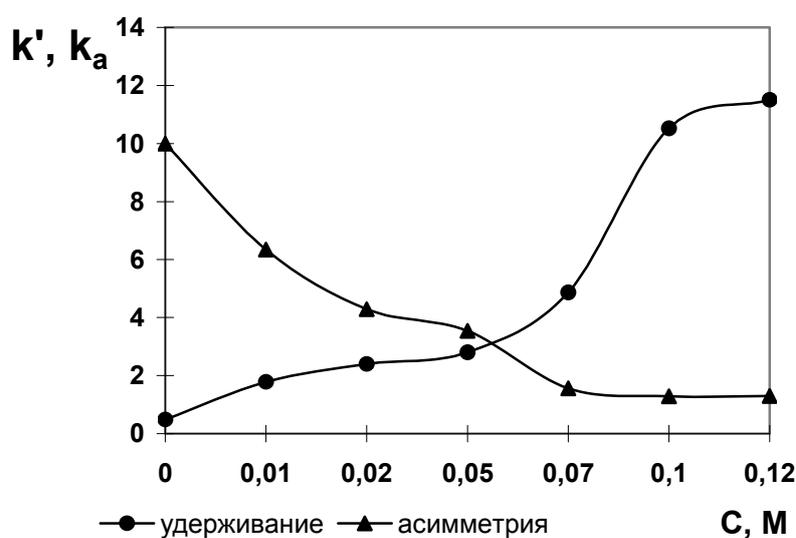


Рис. 6. Зависимость удерживания ( $k'$ ) и асимметрии ( $k_a$ ) пика карнитина в зависимости от молярной концентрации фосфатного буферного раствора в элюенте, содержащего 70 % ацетонитрила.

Возможность подбором состава элюента ощутимо менять фактор удерживания всех бетаинов позволила нам на основе этой же хроматографической системы разработать методику выделения, очистки и концентрирования бетаинов из плазмы крови, основанную на твердофазной экстракции (ТФЭ).

В качестве сорбционной системы для проведения ТФЭ оптимально использовать ту же систему, что и для хроматографирования бетаинов, но в граничных условиях (максимальное удерживание – минимальное удерживание). Соответственно для этих целей были использованы ТФЭ-картриджи «Диапак Sil», объемом 1 мл, заполненные немодифицированным силикагелем (Силасорб 600) с зернением 30-50 мкм (ЗАО «БиоХимМак», г. Москва).

Очищенный и сконцентрированный образец хроматографировали. Типичная хроматограмма показана на рис. 7. Предел обнаружения бетаинов в крови составил около 0,2 мкг/мл. Погрешность определения бетаинов в крови при их концентрации 0,8 мкг/мл не превышает  $\pm 6\%$ .

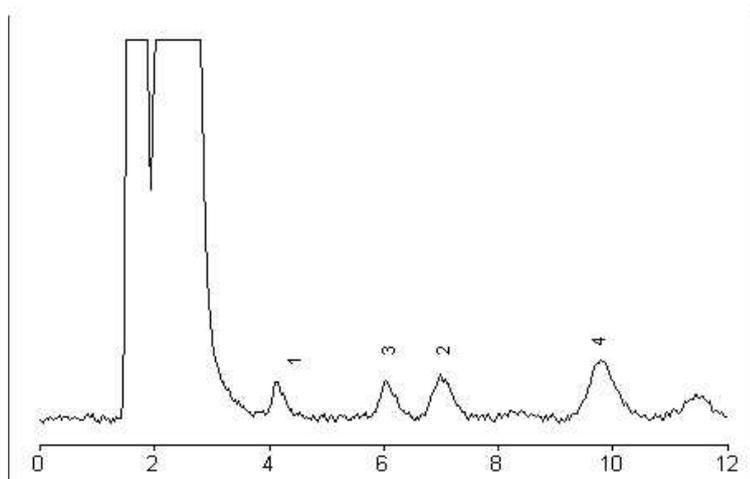


Рис. 7. Хроматограмма нативных бетаинов из плазмы крови, выделенных методом ТФЭ. Условия разделения в подписи к рис. 3. 1– глицинбетаин, 2–  $\beta$ -аланин–бетаин, 3-  $\gamma$ -треонин-бетаин (карнитин), 4- бетаин  $\gamma$ -аминомасляной кислоты.

Несмотря на то, что разработанная методика прямого определения бетаинов в крови с применением ТФЭ полностью решает поставленную задачу, она представляется весьма трудоёмкой и требует довольно большого объёма крови. Кроме того, было желательно ускорить продолжительность анализа с 30-40 до 10-15 мин.

Разработка такой улучшенной методики была выполнена нами благодаря использованию колонок с гетероповерхностными (дифильными) сорбентами, которые за рубежом получили название «RAM-adsorbents».

Такие неподвижные фазы обычно синтезируются на основе силикагеля. К наружной поверхности частиц силикагеля прививаются гидрофильные радикалы, а к внутренней – гидрофобные. При хроматографировании образцов крови, содержащиеся в ней молекулы гидрофильных полимеров – белков - из-за стерических причин не могут проникнуть во внутренний объём частиц сорбента и колонкой не удерживаются, тогда как низкомолекулярные вещества, пройдя

гидрофильный поверхностный барьер, удерживаются внутренней гидрофобной фазой.

Для определения бетаинов в крови нами впервые были применены дифильные сорбенты, внутренняя поверхность зерен которых представляла собой немодифицированный силикагель. Изучались два гетероповерхностных сорбента. Лучшие результаты получены на колонке с неподвижной фазой "Si-600– $\gamma$ -бромпропилтрихлорсилан–альбумин", где роль гидрофильного барьера для белков играл химически привитый альбумин.

Ход анализа существенно упростился и сводился к следующим операциям:

1. В образец крови объемом 0,5 мл добавляли 50 мкл трихлоруксусной кислоты.
2. Раствор с образовавшимся осадком части белков фильтровали под давлением через фильтр с порами 0,2 мкм.
3. 200 мкл фильтрата упаривали до 50 мкл под вакуумом
4. 15-20 мкл полученного раствора хроматографировали.

Типичная хроматограмма приведена на рис. 9.

Использование дифильных сорбентов значительно уменьшило время анализа за счет ускорения процедуры подготовки пробы с сохранением метрологических характеристик методики.

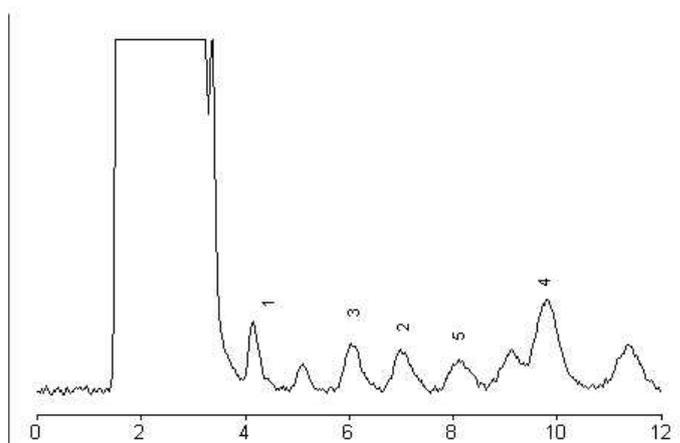


Рис. 8. Хроматограмма образца плазмы крови на колонке с гетероповерхностным сорбентом. Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 198 нм, колонка: 2x80 мм, заполнена Si-600– $\gamma$ -бромпропилтрихлорсилан–альбумин; элюент: 70% ацетонитрила в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,2. 1– глицинбетаин, 2–  $\beta$ -аланин–бетаин, 3–  $\gamma$ -треонин–бетаин (карнитин), 4- бетаин  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, 5– милдронат (триметилгидразинийпропионат).

Нами показано, что динамическое модифицирование силикагеля можно применять не только в колоночной, но и в тонкослойной хроматографии.

Как и в случае колоночной хроматографии, силикагельные пластины для ТСХ можно проводить в двух вариантах: для реализации режима ДИРФ и для эмульсии обращенной (гидрофобной) фазы. Во втором варианте мы добавляли в элюент фосфат тетрабутиламмония или бромистый цетилтриметиламмоний (цетримид).

Таблица 3. Изменение механизма удерживания под действием модификатора

Вещества	Значения $R_f$ веществ при использовании следующих элюентов:		
	Элюент без модификатора	Элюент с добавкой цетримида	Элюент с добавкой соли
Молочная кислота	0,87	0,92	0,51
Гидрохинон	0,98	0,84	0,72
Нафталин	1,00	0,44	0,95

Следует отметить, что эмулирование на пластинке обращенной фазы достигается только при её предварительной промывки элюентом, содержащим соль соответствующего тетраалкиламмония (0,001 - 0,005М) в 0,001М фосфорной кислоте.

Из таблицы 3 видно, что добавление в элюент цетримида приводит к существенному удерживанию нафталина, что говорит о достижении в этих условиях обращенно-фазового режима хроматографии.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружен новый режим модифицирования силикагеля в колоночной и тонкослойной жидкостной хроматографии, названный нами динамически индуцированным разделом фаз (ДИРФ), проявляющийся в виде разделения фаз элюента в результате добавления в него значительного количества неорганических солей.

2. Предложена модель ДИРФ и изучены основные закономерности этого явления. Показано, что оно наблюдается в водно-ацетонитрильных подвижных фазах при концентрации фосфатов, начиная с 0,05 М, причем величина концентрации соли однозначно определяет пороговое содержание ацетонитрила в элюенте, выше которого наблюдается разделение фаз.

3. Исследовано хроматографическое поведение сильнополярных веществ на колонках с силикагелем в подвижных водно-ацетонитрильных фазах с различной концентрацией дигидрофосфата калия при разных значениях рН. Найдено, что для хроматографии бетаинов оптимальной является подвижная фаза вода: ацетонитрил=30:70, содержащая 0,1 М  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  (рН 6,2).

4. Разработаны ВЭЖХ методики определения бетаинов в крови на колонке с силикагелем со стадией концентрирования бетаинов на картриджах с силикагелем в режиме ДИРФ и прямого определения бетаинов в крови на колонке с дифильным сорбентом, внутренняя поверхность частиц которого представляет собой немодифицированный силикагель. При УФ детектировании при длине волны 198 нм предел обнаружения бетаинов в крови составил не менее 0,2 мкг/мл. Погрешность определения концентрации бетаинов в крови на уровне 0,8 мкг/мл составила около 6%.

5. Изучены возможности и ограничения использования динамического модифицирования в практике ТСХ. Показана применимость этого методического приема для практических целей.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Л.В. Сапрыкин, А.А. Сердан, Л.В. Сапрыкина. Прямой анализ бетаинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ. // «Сорбционные и хроматографические процессы». Т.6., Вып. 1, 2006г. стр. 114-122.  
<http://www.anchem.ru/chemanalysis/2005/039-045/asp>.
2. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Некоторые аспекты практического применения динамического модифицирования в ВЭЖХ на силикагелевых сорбентах. // «Сорбционные и хроматографические процессы». Т.6, Вып. 2, 2006г., стр. 284-301.
3. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Современные аспекты динамического модифицирования в ВЭЖХ. // Сборник «Хроматография на благо России», Москва, «ИД Граница», 2007г. стр. 282-298
4. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Динамическое модифицирование сорбентов в практике тонкослойной хроматографии. //Тезисы доклада Всероссийского симпозиума «Хроматография и хроматографические приборы». Москва, 2004г.
5. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Динамическое модифицирование хроматографических систем в практике ВЭЖХ. //Тезисы доклада. Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Применение в нефтехимии». г.Самара, 2005г., стр. 43
6. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Возможности и перспективы применения гидрофильной хроматографии в практике ВЭЖХ. // Тезисы доклада. X Международная конференция « Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии», Москва-Клязьма, 2006г.
7. Л.В. Сапрыкина, Л.В. Сапрыкин. Перспективы использования динамического модифицирования в практике тонкослойной хроматографии. // Тезисы доклада. X Международная конференция «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии», Москва-Клязьма 2006г. с. 239.
8. Л.В. Сапрыкин, Л.В. Сапрыкина. Гидрофильная хроматография как частный случай динамического модифицирования хроматографических систем в ВЭЖХ. // Тезисы доклада. Всероссийский симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях, Москва-Клязьма 2007г., с. 30
9. Л.В. Сапрыкина, Л.В. Сапрыкин. Динамически индуцированный раздел фаз как граничный случай гидрофильной хроматографии. //Тезисы доклада. Всероссийский симпозиум «Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях, Москва-Клязьма 2007г., с. 23