

УДК 543.544 : 547.96; 547.963.32

## ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*A. H. Король*

Критически рассмотрены различные газохроматографические методы анализа аминокислот, оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов, нуклеотидов, а также использование пиролитической газовой хроматографии для определения состава белков и нуклеиновых кислот. Проведено сравнение лучших аналитических результатов исследования смесей перечисленных соединений при использовании газожидкостной хроматографии и жидкостной хроматографии высокого давления.

Библиография — 243 ссылки.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	2264
II. Получение и разделение летучих производных аминокислот . . . . .	2266
III. Разделение оптических изомеров аминокислот . . . . .	2277
IV. Разделение пептидов . . . . .	2280
V. Применение пиролитической газовой хроматографии . . . . .	2281
VI. Определение последовательности аминокислот в белках . . . . .	2282
VII. Определение аминокислот в биологических объектах и геологии . . . . .	2284
VIII. Разделение оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов и нуклеотидов . . . . .	2285

### I. ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярной биологии и смежных дисциплин невозможно без установления структуры белков и нуклеиновых кислот, т. е. последовательности мономерных звеньев (аминокислот АК и нуклеотидов) в их молекулах. Эта процедура весьма трудоемка, если учесть большой молекулярный вес биополимеров; поэтому автоматизация и сокращение времени таких определений весьма существенны.

При разделении смесей белков и нуклеиновых кислот, качественном и количественном анализе продуктов их распада широко используются методы жидкостной хроматографии. Однако классические варианты таких методов трудоемки и малочувствительны, поэтому после открытия метода газожидкостной хроматографии<sup>1</sup> исследователи сразу же заинтересовались возможностью его использования для разделения смесей АК<sup>2</sup>. Но необходимость превращения АК для анализа в летучие производные, которые не отличаются стабильностью, создала существенные трудности на пути применения ГЖХ.

В 1958 г. был разработан автоматический метод анализа смесей  $\alpha$ -АК при использовании ионообменной хроматографии<sup>3-6</sup> с фотоколориметром для детектирования производных АК; время полного анализа составляло несколько часов, а чувствительность определения — до  $10^{-7}$  молей. К концу 60-х гг. были выпущены первые модели жидкостных хроматографов высокого давления (ЖХВД) с детектором по поглощению в УФ-области спектра, что позволило снизить время анализа смеси  $\alpha$ -АК до 1 часа и повысить чувствительность до  $10^{-9}$  моля.

К ограничениям ЖХВД относится необходимость получения содержащих в молекуле ароматические ядра производных АК для их детектирования по УФ-спектрам. Казалось бы, ЖХВД должна была полностью вытеснить ГЖХ из практики лабораторных исследований биополимеров. Однако, у метода ГЖХ имеются некоторые преимущества по сравнению с ЖХВД: на 2—3 порядка более высокая чувствительность, несравненно большая разделяющая способность и меньшая стоимость аппаратуры (таблица). Этим и объясняется развитие исследований по применению

**Сопоставление оптимальных параметров ГЖХ и ЖХВД при анализе продуктов распада белков и нуклеиновых кислот**

Параметр	ГЖХ	ЖХВД
<b>Разделение смесей АК:</b>		
время разделения смеси 20 белковых АК	15 мин	70 мин
порог обнаружения — средний	$10^{-8}$ г (ПИД)	$10^{-7}$ г
минимальный	$10^{-12}$ г (ЭЗД)	$10^{-8}$ г
устойчивость производных для анализа	средняя	большая
возможность разделения оптических изомеров	возможно	невозможно
общая длительность одного определения	<1 часа	~1 часа
<b>Анализ ФТГ АК:</b>		
время разделения или идентификации	50 мин	
порог обнаружения	$10^{-10}$ г (ПФД)	$10^{-7}$ г
<b>Анализ МТГ АК:</b>		
время разделения или идентификации	50 мин	не используется
<b>Анализ пептидов:</b>		
предельно возможное количество АК в одной молекуле	4 (12*)	не лимитируется
возможность установления структуры	возможно	невозможно
<b>Основания нуклеиновых кислот:</b>		
время разделения	24 мин	
порог обнаружения	$10^{-9}$ г	$10^{-7}$ г
Стоимость комплекта аппаратуры, тыс. долл.	10	50

\* Теоретически возможное количество.

ГЖХ для анализа продуктов распада биополимеров и широкое применение ГЖХ в практике биохимических исследований наряду с ЖХВД.

Вопросы газохроматографического анализа АК и оснований нуклеиновых кислот (здесь и далее в тексте автор для краткости употребляет термин «основания нуклеиновых кислот», под которым понимает пуриновые и пиримидиновые основания, главные и миорные, входящие в состав нуклеиновых кислот и их фрагментов — нуклеотидов и нуклеозидов) рассмотрены более, чем в 500 статьях. Однако обзоры по этому вопросу либо устарели<sup>6—14</sup>, либо освещают отдельные вопросы<sup>15—17</sup>; достаточно полные обзоры ГЖХ-анализа АК появились лишь недавно<sup>18—20</sup>. В обзоре<sup>19</sup> основное внимание удалено количественным аспектам анализа АК, вопросы пиролитической ГЖХ и разделения гидантоневых производных АК в нем почти не затронуты. Кроме того, ряд принципиально новых методик анализа АК и оснований нуклеиновых кислот появился за последние 1—2 года.

Цель настоящего обзора — критическое рассмотрение методов газохроматографического анализа АК, оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов, нуклеотидов, пептидов, белков и нуклеиновых кислот и сравнение лучших газохроматографических методик с данными других хроматографических методов. Большая часть перечисленных соединений не поддается прямому газохроматографическому определению вслед-

ствие их нелетучести, поэтому основное внимание уделяется количественным методам получения летучих продуктов разложения биополимеров\*.

## II. ПОЛУЧЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

В состав белков входит 20  $\alpha$ -АК — так называемые белковые АК. Ряд других АК также встречается в природе, некоторые производные АК являются гормонами. АК могут быть классифицированы по реакционной способности, зависящей от радикала ( $R$ ) при аминокислотной группе  $H_2N—CH—COOH$ ; для разных групп характерны различные трудности получения летучих производных АК и их газохроматографического разделения. К первой группе относятся АК, обладающие минимальной реакционной способностью: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин и пролин. Во вторую группу входят треонин, серин, лизин, тирозин, аспарагин, глутамин. Наиболее реакционноспособны АК третьей группы: аргинин, цистеин, триптофан и гистидин. Кроме того, встречается ряд других АК, как, например, норвалин,  $\alpha$ -аминомасляная кислота, норлейцин, цистин. Некоторые АК содержат иод (тироэины); встречаются многие АК, содержащие серу.

При нагревании АК декарбоксилируются до соответствующих аминов. В области температур от 180 до 240° АК первой группы, за исключением изолейцина, а также треонина, серин и норвалина, превращаются в амины, молекулы которых содержат на один атом углерода меньше, чем в исходных АК<sup>10</sup>. При повышении температуры до 300° образуются комплексы аммиака с аминами, молекулы которых содержат от 1 до 5 атомов углерода<sup>10</sup>. При полном термическом разложении АК выделяется азот, что использовано в ранних работах<sup>10</sup> для качественного определения АК. В настоящее время для этой цели целесообразнее применять термоионные детекторы (ТИД), селективные к азоту<sup>21</sup>.

При дезаминировании в качестве конечного продукта образуются альдегиды, сравнительно легко определяемые методом ГЖХ. Исследовано<sup>10</sup> окисление АК гипохлоритом натрия на примере  $\alpha$ -аминомасляной кислоты, норвалина, валина, норлейцина; полученные при этом альдегиды разделены при 92° на колонке с динонилфталатом. Однако гипохлорит натрия оказался слишком сильным окислителем, вызывающим деструкцию углеродного скелета АК, поэтому выход альдегида из АК не был количественным.

Нингидрин использован для превращения лейцина и изолейцина в альдегиды, которые затем разделены на силиконовом масле при 69°. За время реакции от 15 до 30 мин аланин, валин, изолейцин, лейцин, норлейцин, метионин, треонин и  $\alpha$ -аминомасляная кислота количественно превращаются в альдегиды. Превращены в альдегиды также глицин и фенилаланин. АК окисляются нингидрином в реакторе<sup>10-22</sup>, представляющем колонку, заполненную пропитанным нингидридом, твердым носителем. Описано<sup>10</sup> превращение аланина, валина, норвалина, лейцина, изолейцина, норлейцина в альдегиды при температуре реактора 125°; соответствующие альдегиды разделены на колонке с глицерином и силиконовым маслом при 65°.

Метод получения альдегидов из АК, несмотря на неудачи при его применении ко всем белковым АК, весьма привлекателен с точки зрения легкости разделения летучих производных. В последнее время появив-

\* Ввиду ограниченности объема обзора часть ссылок на оригинальные работы (в большинстве — примеры использования методик) цитируются по опубликованным обзорам.

лась работа<sup>23</sup> по превращению АК в альдегиды с использованием николината серебра в водной среде для анализа смеси аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, глицина и норлейцина; альдегиды разделяли на колонке с полиэтиленгликолем-4000. Предлагается<sup>10</sup> полученные из АК альдегиды окислять до кислот при помощи перманганата с последующим их определением при 150° на колонке с полипропиленгликолем, что вряд ли целесообразно, поскольку трудности хроматографического определения кислот значительно выше, чем для альдегидов. Попытки применить ингибиторный метод для получения альдегидов из АК второй и третьей групп оказались безуспешными.

Дезаминирование проходит также при добавлении нитрита натрия в уксусной кислоте; полученную кислоту этерифицируют диазометаном, а метиловые эфиры разделяются на колонке с силиконовым маслом с программированием температуры<sup>18</sup>. Исследование смеси глицина, аланина, валина, лейцина, аспарагина и грутамина показало<sup>24</sup>, что эта реакция не количественная, хотя систематическая ошибка постоянна и находится в пределах от 2 до 10%. Таким же методом изучены эфиры изолейцина, треонина, метионина, фенилаланина, гистидина и аргинина. Полученные из пяти АК первой группы метиловые эфиры разделены на капилярной колонке с апизоном L при 130°<sup>18</sup>.

Аминокислоты декарбоксилируются N-бромсукцинимидом, что использовано для анализа производных аланина, валина, лейцина, фенилаланина и норвалина<sup>18</sup>; соотношение получаемых при этой реакции нитрилов и альдегидов изменяется в широких пределах, однако преимущественно образуются нитрилы. Продукты превращения аланина, валина, лейцина, изолейцина, норлейцина, норвалина и  $\alpha$ -амино-масляной кислоты разделяли на колонке с силиконовым маслом. Нитрилы АК образуются также при обработке их иодобензолом; продукты реакции разделены на полиэтиленгликоле и 1,2,3-три(2-цианэтокси)-пропане<sup>18</sup>.

Карбоксильная группа АК восстанавливается до гидроксильной алюмогидридом лития с образованием соответствующего аминоспирта. Продукты восстановления АК первой группы (кроме пролина) разделили на колонке с 20% силиконового масла SE-96 или SE-52 в интервале температур от 155 до 200°<sup>10</sup>. Аминоспирт, полученный из триптофана, при этих условиях не выходит из колонки, а соответствующее производное глицина маскируется пиком растворителя; при разделении этих продуктов применялись также и полярная неподвижная фаза — полиэтиленгликоль (ПЭГ)-3000; этот метод использован для установления состава гидролизата пептидов<sup>18</sup>.

При обработке АК первой группы смесью соляной и азотной кислот образуются  $\alpha$ -хлорпроизводные, метиловые эфиры которых разделены на смеси ПЭГ с силиконовым маслом и стearиновой кислотой<sup>18</sup>; такой метод применен для обнаружения норлейцина и норвалина в природных продуктах и для установления структуры дипептидов<sup>18</sup>. При конверсии АК в метиловые эфиры  $\alpha$ -хлоркислот на хроматограмме не зарегистрированы производные, соответствующие фенилаланину и метионину, а при обработке серина получено два пика. Описано получение N-тиокарбонильных производных АК из их  $\alpha$ -пропиоловых эфиров; при этом триптофан не вступает в реакцию, а цистин и цистеин образуют только тиокарбаматы<sup>25</sup>.

Даже последние сравнительно мягкие методы получения летучих производных АК путем удаления активных групп не нашли применения в аналитической практике вследствие трудности количественного превращения АК второй и третьей групп.

Обычно при приготовлении метиловых эфиров АК в присутствии хлористого водорода как катализатора получают хлоргидраты метиловых эфиров. Свободные эфиры образуются при встряхивании метанольного раствора соли с ионообменной смолой; полученные растворы сохранялись без изменений от 1 до 24 час<sup>1c</sup>. Разделение метиловых эфиров АК со свободной аминогруппой осуществлено на колонке с 2% полинеопентилгликольсукината на фторопаке-80; диатомитовые носители оказались активными для этих систем. Большие трудности возникли при хроматографировании метиловых эфиров тирозина, гистидина и триптофана. Попытки перевода солянокислых солей в свободные эфиры термической диссоциацией в нагретом дозаторе хроматографа оказались безуспешными. Колонки с указанным выше сорбентом использовали для разделения производных изомерных гидроксипролинов. Эфиры АК и спиртов  $C_2-C_4$  малолетучи и поэтому менее пригодны для ГЖХ. Масс-спектрометрическое исследование структуры этиловых эфиров ряда АК показало<sup>18</sup>, что все эти производные действительно являются этиловыми эфирами, за исключением циклизующегося в лактам орнитина.

Наиболее распространенный способ получения эфиров АК состоит в обработке АК безводным спиртом в присутствии HCl; иногда используют в качестве катализатора бромистый водород и серную кислоту. Вместо спиртов используют производные диазосоединений. Необходимым условием количественной этерификации АК служит отсутствие влаги в реагентах и в исходном образце. Для высушивания небольших количеств водных растворов АК используют нагреваемую током платиновую спираль<sup>26</sup> в атмосфере инертного газа. Этерификация АК проходит количественно при 70° в течение 30 мин<sup>23</sup>, хотя имеются сведения о других режимах: 30 мин при 20° в 1,25 N растворе хлористого водорода в метаноле<sup>27</sup>.  $\eta$ -Пропиловый эфир АК образуется за 20 мин при 100° обработкой АК 8 N раствором хлористого водорода в  $\eta$ -пропаноле<sup>28</sup>. В качестве катализаторов этерификации используют также ацетилхлорид с метанолом или ортоформиат в метанольном растворе хлористого водорода. Эфиры также получаются при кипячении с обратным холодильником АК и спирта в присутствии ионообменной смолы<sup>18</sup>. Метилирование диметилсульфидом в метанольном растворе хлористого водорода при кипячении с обратным холодильником проходит количественно и быстро<sup>18, 29</sup>; используется метилирование тионилхлоридом с метанолом<sup>30</sup>.

Получение эфиров АК и высших спиртов осложняется небольшой растворимостью АК в этих спиртах; особенно это относится к цистеину, лизину и гистидину. Для преодоления таких трудностей предлагают<sup>18</sup> получать вначале метиловые эфиры АК, а затем проводить переэтерификацию (например, 1,25 N раствором хлористого водорода в  $\eta$ -бутианоле при 100° в течение 150 мин<sup>23</sup>). Более распространен в аналитической практике метод диспергирования АК в спиртах  $C_3-C_5$  при помощи ультразвука: взвесь АК в  $\eta$ -бутианоле обрабатывали ультразвуком в течение 15 сек<sup>31</sup>. Однако недавно<sup>32</sup> установлено, что при таком режиме лишь 50% от общего количества АК вступает в реакцию этерификации, и поэтому рекомендуется обрабатывать взвесь ультразвуком в течение 5 мин, а для более полного растворения АК следует добавить дихлорметан (10% от общего количества). Этерификация  $\eta$ -бутианолом проводится в 3,5 N растворе хлористого водорода за 15 мин при 150°<sup>32</sup>; наиболее трудно этерифицируются изолейцин (на 85%), а триптофан разлагается на 15%. При продлении этерификации до 2,5 час изолейцин этерифицируется полностью, но при этом также полностью разлагается триптофан<sup>31-36</sup>. Для улучшения растворения АК в спиртах можно

использовать добавки трифтормукусной кислоты; тогда гидрохлорид лизина полностью этерифицируется при  $108^\circ$  в токе сухого хлористого водорода<sup>37</sup>. Этерификация АК возможна и с использованием иодбутана в присутствии гидроокиси фенилтритметил- или тетраметиламмония в метаноле; эта реакция протекает при комнатной температуре за 10 мин в среде N-диметилформамида<sup>38</sup>.

Таким образом, этерификация карбоксильной группы позволяет количественно получить почти все производные белковых АК. Однако такие эфиры являются или хлоргидратами или свободными эфирами АК со свободными аминогруппами, т. е. содержат по крайней мере одну активную группу, снижающую летучесть производного и обуславливающую заметную адсорбцию разделяемых соединений на диатомитовых носителях.

Для ацилирования второй активной группы использована<sup>10</sup> муравьиная кислота в среде уксусного ангидрида. Разделение полученных производных осуществлено на колонке с 25% высоковакуумного масла при температуре  $194^\circ$ , причем превращение АК в метиловые эфиры N-формиатов составило не менее 95%. В метиловых эфирах N-формиатов отсутствуют атомы водорода, способные образовывать водородную связь, однако полярность таких эфиров весьма велика, что препятствует их эффективному хроматографическому разделению. Действительно,  $\alpha$ -АК представляет собой молекулу, состоящую из радикала и аминокислотной группы. Эти кислоты отличаются друг от друга только природой радикала, поэтому для успешного определения АК методом ГЖХ влияние аминокислотной группы (свободной или электрифицированной и ацилированной) на удерживание соединения должно быть минимальным. Это требование осуществляется только в том случае, когда входящая в  $\alpha$ -АК аминокислотная группа связывается с неподвижной фазой лишь дисперсионными силами, т. е. при полном экранировании алкильными радикалами полярных связей. Как правило, метильная группа экранирует полярные связи лишь в небольшой степени. Эти соображения были подтверждены экспериментально: сравнение газохроматографического поведения эфиров N-формиатов и N-ацетатов АК показало<sup>39</sup>, что времена удерживания этих производных сравнимы, однако качество разделения эфиров N-ацетатов несравненно выше, чем N-формиатов; это заставило отказаться от использования последних для анализа смесей АК. Показано<sup>40</sup>, что логарифм времени удерживания эфиров спиртов  $C_2$ — $C_5$  N-ацетатов АК пропорционален молекулярному весу спирта при использовании как полярных, так и неполярных неподвижных фаз; это указывает на достаточно полное экранирование полярных групп этильным радикалом.

Для получения ацетатов необходимо использовать уксусный ангидрид, однако его ацилирующая способность не столь велика, чтобы количественно ацилировать хлоргидрат эфира аргинина даже при  $150^\circ$ . Поэтому предлагают<sup>28</sup> пропустить этот эфир через ионообменную смолу или нейтрализовать соль карбонатом щелочного металла; можно также энзиматически превращать аргинин в орнитин, а гистидин — озонолизом в аспарагин<sup>18</sup>, однако трудоемкость таких методов не позволяет их рекомендовать. Целесообразнее ацилировать эфиры АК смешанным реагентом, состоящим из ацетона, триэтиламина и уксусного ангидрида в соотношении 5:2:1<sup>41</sup> при температуре  $60^\circ$  в течение 30 сек; при этом аргинин воспроизведимо ацилируется на 78%.

Изучено газохроматографическое поведение метиловых и этиловых эфиров N-ацетатов АК<sup>10, 39</sup>,  $n$ - и изопропиловых эфиров<sup>10, 28, 41–44</sup>,  $n$ - и изобутиловых эфиров<sup>10, 41</sup>,  $n$ - и изоамиловых эфиров<sup>10, 45</sup>.

Наилучшие результаты по разделению смеси белковых АК описаны в работе<sup>42</sup>. Этерификация АК проводилась при 110° в течение 20 мин в 8 N растворе *n*-пропанола, ацилирование проводили при 60° в течение 30 сек смесью ацетона, триэтиламина и уксусного ангидрида в соотношении 5 : 2 : 1. Полученные эфиры не разлагаются в течение нескольких дней при комнатной температуре, а при температуре 4° могут храниться несколько месяцев. Температурный режим разделения такой: температура блока дозатора и детектора соответственно 250 и 300°, температура колонки программируется от 125 до 180° со скоростью 8 град/мин и от 180 до 250° со скоростью 32 град/мин. Колонка длиной 90 см и диаметром 3 мм заполнена сорбентом, представляющим нанесенную на хромосорб W смешанную неподвижную фазу (0,31% карбовакс 20М, 0,28% силар 5СР и 0,06% лексан). Носитель перед нанесением неподвижной фазы прогревается в течение часа при 400°. Эффективность полученной колонки 2250—2400 т. т. по производному триптофана, стандарт — норлейцин. Ввод пробы осуществляется автоматическим капсулным дозатором фирмы Перкин — Элмер. При таких условиях в течение 15 мин разделены производные белковых АК всех трех групп, а также орнитин и гидроксипролин с порогом обнаружения 10<sup>-12</sup> моля; воспроизводимость количественного анализа 2—5%. Определенные трудности были отмечены при анализе цистина. Эти трудности преодолены в работе<sup>46</sup>, где предложено сперва превращать цистин и цистеин в их S-карбоксиметилпроизводные. Цистеин и цистин в этом случае определяются в виде суммы. Подобные смеси, но с худшими результатами, были разделены в более ранних работах<sup>43, 44</sup>. Разделение АК в виде *n*-пропиловых эфиров N-ацетатов стало возможным лишь в последнее время благодаря появлению новой аппаратуры и разработке новых вариантов высокотемпературной хроматографии; на первых этапах развития ГЖХ основные усилия были направлены на синтез более летучих производных АК, в качестве которых были выбраны эфиры перфторированных кислот. Перфторированные производные выходят из колонки в 3—6 раз быстрее, чем их нефтотированые аналоги, что и предопределило на долгое время анализ АК в виде производных перфторированных кислот. Получение и газохроматографические свойства метиловых эфиров N-ТФА АК описаны в<sup>18, 35, 47—56</sup>, и, хотя не удалось за один анализ разделить производные всех 20 белковых АК, эти исследования существенно обогатили опыт работы с производными перфторированных эфиров. В частности, было обнаружено, что на полярных неподвижных фазах типа полизифиров и цианпроизводных O-ТФА и S-ТФА АК разлагаются.

В принципе получение эфир-ацильных производных АК возможно двумя способами: а) вначале получают эфир АК, а затем его ацилируют и б) вначале проводят ацилирование, а затем — этерификацию. В последнем случае не образуются эфиры оксикислот, а аргинин и гистидин не образуют летучих продуктов, поэтому для количественного анализа используют первый метод. Хлористоводородные соли метиловых эфиров АК количественно ацилируются трифторуксусным ангидридом (ТФУА) при 120° за 20 мин<sup>10</sup>. Рекомендуют<sup>33, 34, 36</sup> сухой эфир ацилировать 50-кратным избытком ТФУА при 180° за 5 мин; наиболее трудно ацилируются эфиры аргинина и гистидина, а производные цистеина и окси-АК в наибольшей степени подвергаются гидролизу. Следует учитывать, что эфиры ТФУА весьма чувствительны к влаге, поэтому рекомендуется вводить реакционную смесь в дозатор хроматографа без предварительного испарения реагентов и растворителя. При выпаривании растворителя возможна неконтролируемая потеря наи-

более летучих эфиров аланина, глицина и валина, поэтому при удалении растворителя температура смеси не должна превышать 0°. Поскольку производное гистидина наименее стабильно, рекомендуют<sup>57</sup> превращать его в N-ТФА-N-карбэтокси-*n*-бутильное производное, что резко улучшает его обнаружение. Некоторые авторы<sup>58–60</sup> советуют для предотвращения гидролиза производного гистидина добавлять перед вводом пробы избыток ацилирующего агента, так как частичное испарение его из реакционной среды служит причиной появления на хроматограмме пика моноацилированного производного гистидина<sup>61</sup>. Ацилирование всех белковых АК, кроме аргинина и гистидина, достигается за короткое время при комнатной температуре.

При анализе метиловых эфиров N-ТФА 20 белковых АК на колонке с неопентилгликольсукиннатом с программированием температуры остались неразделенными глицин и лейцин, а также глутамин и фенилаланин; кроме того, производное аргинина дает три пика и наблюдаются значительные трудности с анализом цистеина и гистидина<sup>18</sup>. Наилучшее разделение метиловых эфиров N-ТФА АК получено на колонке длиной 3,25 м, заполненной диатопортом S с 1,5% смешанной неподвижной фазы (силиконовые масла ХЕ-60, QF-1 и MS-200 в соотношении 46 : 27 : 27) при программировании температуры от 90 до 231°; при этом производное гистидина не выходит из колонки. Время разделения 85 мин.

Широкое использование метиловых эфиров характерно для первых этапов применения перфторированных производных АК, однако высокая полярность метиловых эфиров ухудшает качество разделения, а их высокая летучесть снижает точность количественного анализа, в особенности для производных аланина, валина, глицина и лейцина. Эти недостатки заставили обратить внимание на эфиры более высококипящих спиртов: этилового<sup>10</sup>, изопропилового<sup>10, 62, 63</sup>, *n*-пропилового<sup>18, 44</sup>, бутанола-2<sup>18, 19, 64, 65</sup>, *n*-бутанола<sup>18, 31, 33, 34, 58, 66–71</sup>, *n*- и изоамилового<sup>18, 37, 72–74</sup>, бензилового, а также — виниловые эфиры<sup>18</sup>.

Наибольшее распространение для газохроматографического анализа нашли производные *n*-бутанола, что во многом связано с работами школы Герке. Достаточно большой алкильный радикал *n*-бутанола хорошо экранирует полярную эфирную группу, а производные обладают умеренной летучестью. Описано<sup>33, 34</sup> полное разделение таких производных АК на двух колонках. Длина каждой колонки составляет 1,5 м, одна из них заполнена супелкопортом, пропитанным 2% силиконового масла OV-17 и 1% силиконового масла OV-210, вторая — хромосорбом W, пропитанным 0,65% ПЭГА. Температуру колонок программируют от 60 до 225°. Из колонки с ПЭГА не выделяются гистидин, аргинин, цистеин; для определения последних трех АК служит колонка с силиконовыми маслами. Кроме того, вместе со всеми белковыми АК разделены также гидроксипролин и орнитин. При параллельной записи хроматограмм от двух колонок общее время разделения не превышает 30 мин. Срок службы колонок от 2 до 6 месяцев. Несколько варьировалось количество неподвижных фаз на этих носителях в другой работе<sup>75</sup>, где количество ПЭГА составило 1%, а силиконового масла OV-17—4,5%.

При хроматографическом анализе особое внимание обращается на отсутствие контакта паров производных АК с нагретыми металлическими поверхностями: дозатор, колонка и ввод в детектор должны быть стеклянными. Газ-носитель осушается молекулярными ситами (в первую очередь гидролизуются производные глутамина и аспарагина). Все стеклянные поверхности, соприкасающиеся с парами производных

АК, включая и стекловату для закупорки колонок, должны быть силанизированы 10%-ным раствором диметилдихлорсилана в толуоле при комнатной температуре в течение 10—12 час и затем промыты метанолом, толуолом с последующей сушкой при 200°. Неработающая аппаратура должна продуваться газом-носителем при температуре 200°.

В описанных методиках использованы небольшие количества неподвижной фазы на носителе. Однако при таких условиях особенно большое влияние на формирование объема удерживания оказывают различные адсорбционные эффекты, связанные с наличием активных межфазных поверхностей в хроматографической колонке. Влияние межфазной адсорбции на объем удерживания производных АК настолько велико, что при изменении количества неподвижной фазы на носителе в пределах от 0,5 до 2% порядок выхода производных метионина, гидроксипролина и фенилаланина, а также пары лейцин — изолейцин меняется<sup>76</sup>. Подобные эффекты крайне нежелательны при создании надежных, воспроизводимых методик для серийных анализов. Основной активной межфазной поверхностью в случае разделения производных АК служит поверхность раздела твердый носитель — неподвижная фаза, что заставляет с особым вниманием подойти к выбору носителя. При использовании ПЭГ в качестве неподвижной фазы инертность носителя по отношению к производным АК возрастает в ряду: хромосорб W AW, хромосорб W AW DMCS, газохром Q, хромосорб W HP или хромосорб G HP<sup>28, 77</sup>; однако иногда совершенно неожиданно наилучшими оказываются далеко не самые инертные носители, как, например, хромосорб WAW<sup>78</sup>. Производное аргинина выходит из колонки с OV-17, нанесенным на хромосорб W HP, но не выделяется из колонки при использовании сорбента на основе хромосорба G HP.

Двухколоночная схема анализа не оптимальна, в частности, необходимо вести запись на двух самописцах. Можно было бы последовательно анализировать производные АК на каждой колонке и записывать на одном регистраторе, но это удлиняет время анализа до 50 мин. Применение переключателей записи от колонок и некоторое смещение во времени при вводе пробы в каждую из колонок дает возможность сократить время до 35 мин<sup>79</sup>.

Основным препятствием при создании одноколоночной методики анализа белковых АК служит низкая избирательность неполярных или малополярных неподвижных фаз; полиэфирные неподвижные фазы обладают хорошей избирательностью для разделения этих веществ, однако О-ТФА и S-ТФА АК реагируют с ними. Успешного разделения смеси удалось достичь лишь увеличив количество неподвижной фазы (апиезон M) в колонке до 10% от веса хромосорба W<sup>80</sup>. При использовании таких количеств неподвижной фазы снижаются адсорбционные эффекты, что позволяет сделать методику более воспроизводимой. На колонке с таким сорбентом длиной 2,5 м при программировании температуры от 90 до 260° за 35 мин разделены 18 производных белковых АК, включая цистин и гидроксипролин. Часть производных (14% метионина, 37% гистидина и 54% цистеина) не выходит из колонки, однако эти величины являются воспроизводимыми и не снижают ценности количественной методики. Относительная ошибка определения составляет 5%.

Применение несложных приспособлений для сброса избытка реагента и растворителя<sup>62</sup> позволяет определять до 10<sup>-9</sup> г АК при использовании пламенно-ионизационного детектора (ПИД) и до 10<sup>-12</sup> г АК с электронно-захватным детектором (ЭЗД). Промежуточной чувстви-

тельностью обладает термоионный детектор (ТИД) с солями рубидия, обнаруживающий азотсодержащие соединения<sup>81</sup>. Последний детектор весьма удобен для количественных расчетов, так как его сигнал пропорционален количеству атомов азота в молекуле исследуемого соединения и поэтому отпадает необходимость в предварительной калибровке; чувствительность такого детектора в 3—20 раз выше, чем у ПИД. Повышение чувствительности определения АК достигается ацилированием АК хлорфосфатом в диэтиловом эфире или в ацетонитриле в присутствии триэтиламина; реакция протекает при комнатной температуре за 30 мин, хотя не для всех АК выход продуктов количественный. Эти производные обнаруживаются при помощи ТИД с порогом  $10^{-12}$  г<sup>82</sup>. Разделение таких производных АК первой группы и аспарагина, глицина и  $\beta$ -аланина достигается на двухметровой колонке, содержащей 6% силиконового масла OV-17 на хромосорбе G НР при программировании температуры от 210 до 250°. Эта методика использована для установления последовательности АК в белках грамицидина S.

Исключительно высокая чувствительность газохроматографического метода позволила определить АК в образцах лунного грунта, привезенного экипажами кораблей Аполлон 11 и 12<sup>83</sup>.

Затраты времени на приготовление летучих производных АК сравнимы с временем разделения этих соединений: в связи с этим появился ряд работ по интенсификации процесса приготовления проб. Например, могут быть использованы три раздельно подогреваемых алюминиевых блока с гнездами для ампул, где проводятся все операции по приготовлению производных<sup>84</sup>. Наиболее радикальным решением проблемы является метод, предложенный для получения метиловых эфиров N-гептафторбутиратов (ГФБ) АК<sup>85</sup> с использованием автоматического капсулного дозатора фирмы Перкин — Элмер типа MS-41. Образец и реагенты для метилирования помещают в золотую капсулу, которую затем закрывают; процесс проводится при 80° в течение 10 мин. После этого капсулу открывают и удаляют влагу азеотропной отгонкой с метиленхлоридом. Хлоридраты метиловых эфиров АК могут храниться длительное время в экскикаторе. Перед проведением анализа в капсулу добавляется ацилирующий агент и реакция проходит в закрытой капсule при повышенной температуре; охлажденная капсула помещается в транспортер автоматического дозатора. Дальнейшие аналитические операции и расчет результатов осуществляются автоматически.

Поиски пригодных для ГЖХ производных АК не ограничились ТФА; испытано ацилирование пентафторпропионовой<sup>59, 86—89</sup> и гептафторасплюской<sup>59, 61, 85, 86, 90, 91</sup> кислотами. Использование производных с большим числом атомов фтора в молекуле повышает чувствительность к ним ЭЗД, а увеличение неполярного радикала благоприятно влияет на избирательность колонок. Пониженная полярность гептафторбутиратов (ГФБ) АК приводит к уменьшению их времени удерживания на 35% по сравнению с ТФА АК. Отмечается, что ГФБ АК не столь чувствительны к влаге, как ТФА, АК, они могут быть промыты органическими растворителями без опасности гидролиза, а удаление избытка реагента и растворителя из реакционной смеси не вызывает затруднений<sup>91</sup>. Например, растворы *n*-пропиоловых эфиров ГФБ АК можно упаривать без опасений изменить количественный состав производных АК; при этом одновременно уменьшается маскирующее влияние пика растворителя на наиболее летучие компоненты смеси АК. К недостаткам гептафторасплюского ангидрида относится его высокая стоимость, токсичность и неприятный, стойкий запах.

*n*-Пропиловые эфиры ГФБ 19 белковых АК были разделены на 35 мин на стеклянной капиллярной колонке с химически связанным диметилполисилоксаном при программировании температуры от 70 до 230°<sup>159</sup>; изолейцин образует два пика, один из которых относится к изолейцину, а второй — к аллоизолейцину. *n*-Пропиловые эфиры ГФБ 18 АК, включая гидроксипролин и цистин, разделяли за 43 мин на стеклянной колонке длиной 3,6 м с 3% силиконового масла OV-1 при программировании температуры от 100 до 250°<sup>185</sup>. Для лучшего определения гистидина после ввода пробы в колонку вводится небольшое количество уксусного ангидрида; не полностью разделяются метионин и аспаргин.

Разделение 18 белковых АК, пипеноловой кислоты, орнитина, кинуренина и цистина за 35 мин в форме их изоамиловых эфиров ГФБ проведено на стеклянной колонке длиной 3,5 м с 3% силиконового каучука SE-30 при программировании температуры от 70 до 240°<sup>18</sup>; чувствительность определения с ПИД — 10<sup>-10</sup> г АК. При больших количествах глутамина в смеси разделение его с лизином и тирозином ухудшается. Несколько худшие результаты при разделении этих же производных АК получены<sup>91</sup> на стеклянной колонке длиной 2,4 м, заполненной носителем с 15% дексила 300 при программировании температуры от 140 до 270°; не разделяются серин и валин, а гидроксипролин дает два пика, один из которых соответствует его аллоизомеру. Авторы работы<sup>61</sup> считают, что для анализа АК наиболее пригодны изоамиловые эфиры ГФБ АК благодаря отсутствию потерь эфира от испарения при приготовлении проб.

Этерифицированные различными спиртами перфторацильные производные АК находят широкое применение для анализа смесей небелковых АК: АК торфа<sup>92</sup>, метаболитов тирозина и триптофана<sup>93</sup>, иодсодержащих АК<sup>94</sup>, цианэтилАК<sup>18</sup>, смесей гидроксипролина с пролином<sup>18</sup>, смесей, содержащих β-аланин<sup>95</sup>. Разделение эфир-ацильных производных АК с целью их определения в различных биологических объектах и отдельные вопросы таких анализов освещены в ряде публикаций<sup>96—99</sup>.

Итак, этерификация и ацилирование позволяют количественно получать летучие производные всех белковых и многих небелковых АК. Хотя большая часть исследований была посвящена разделению летучих эфиров перфторированных кислот, наилучшие результаты по скорости определения были получены при разделении *n*-пропиловых эфиров N-ацетатов.

К существенным недостаткам получения эфир-ацильных производных АК относится прежде всего двухстадийность процесса, поэтому определенная часть работ посвящена разработке одностадийного процесса получения летучих производных АК и прежде всего триметилсилильных (ТМС) производных. Силирующие агенты вступают в реакцию как с карбоксильной, так и с аминной и гидроксильной группами, что дает возможность провести весь процесс обработки в одну стадию. Наиболее трудно силанизируется аминогруппа, что и лимитирует скорость всего процесса.

Первое сообщение о получении ТМС-производных АК появилось в 1959 г.<sup>100</sup>, почти одновременно с началом исследований по разделению эфир-ацильных производных АК. В качестве силанизирующего агента для АК первой группы использовали триметилхлорсилан (ТМХС), причем силанизирование проходило количественно. Все эти производные, за исключением эфиров метионина и пролина, разделены при 165° на колонке с силиконовым маслом; найдено, что производные цистеина, лизина и гистидина в колонке частично разлагаются.

Все силильные производные АК чрезвычайно чувствительны к влаге и кислороду<sup>15, 101</sup>: даже свежую резиновую прокладку дозатора необходимо тренировать 2—3 раза перед анализом для удаления из нее влаги. Большая лабильность ТМС-производных АК и трудности количественного силанизирования всех белковых АК привели к длительному перерыву в исследованиях по их применению в ГЖХ. Для увеличения стабильности ТМС-производных из зоны реакции необходимо удалять образующийся диэтиламин и тщательно очищать исходные продукты. В связи с недостаточной силирующей способностью ТМХС начались поиски оптимальных силанизирующих агентов. Для силанизирования использовали смесь ТМХС с гексадиметилдисилазаном (ГМДС)<sup>15</sup>. При этом наиболее трудно силанизируются лейцин, серин, аспарагин; силанизирование трех последних АК улучшается при использовании в качестве реагента триметилсилилдиэтиламина в присутствии окислов алюминия и кремния как катализаторов. Детальное исследование процесса показало, что при реакции образуются производные с различным количеством ТМС-групп. Производные с большим числом ТМС-групп менее летучи; поэтому целесообразно останавливать процесс на ранних стадиях<sup>102</sup>. В качестве силанизирующих агентов предлагались различные вещества: триметилсилидиэтиламин, триметилсилиламин, *bis*(три-метилсилил)ацетамид — БСА, *bis*( trimethylsilyl) трифторацетамид — БСТФА и N-метил-N-триметилсилилацетамид. При использовании неполярных растворителей лучшими агентами оказались амины<sup>103</sup>. Кроме того, испытаны N-триметилсилиламидалозол и N-триметилсилил-N-метилтрифторацетамид<sup>15</sup>.

При использовании полярных растворителей лучшие результаты получены с амидами<sup>104</sup>, особенно с БСА. Однако при разделении на силиконовых неподвижных фазах пики производных глицина и аланина маскируются пиком растворителя, поэтому целесообразнее применять БСТФА<sup>105, 106</sup>. Смесь таких производных всех белковых АК разделена за 42 мин на двухметровой колонке, заполненной супелкопортом с 10% силиконового масла OV-11 при программировании температуры от 80 до 210°<sup>107–109</sup>, орнитин и аргинин при этом не разделяются. Увеличение длины колонки до 6 м позволяет получить хорошее разделение всех компонентов смеси и орнитина. Полиэфирные неподвижные фазы при разделении ТМС-производных АК не применяются, так как вызывают их разложение<sup>110</sup>. Для разделения ТМС-производных 18 белковых АК на стеклянной колонке длиной 3,7 м с 3% силиконового масла DC-550 при программировании температуры от 60 до 280° потребовалось 24 мин.<sup>111–113</sup>, пролин и глутамин не разделялись.

Получение ТМС-производных АК требует тщательного подбора параметров этерификации. Основные трудности количественной этерификации заключаются в необходимости регулирования процесса на стадиях получения моно- и дизамещенных по аминогруппе; это особенно существенно в отношении глицина, триптофана и лизина. Если использовать для проведения силанизирования неполярный растворитель, то из глицина образуется только монозамещенный продукт, однако при этом не реагирует аргинин; добавление к БСТФА 1% ТМХС позволяет силанизировать аргинин, но появляются дизамещенные продукты других АК. В полярном растворителе (ацетонитриле) можно избежать добавления ТМХС, однако время полного силанизирования при 150° составляет 2,5 час. В оптимальном режиме с полярным растворителем реакцию проводят за 1,5 час и этим резко уменьшают содержание дизамещенных продуктов при некотором уменьшении полноты протекания реакции.

Структура некоторых небелковых АК претерпевает изменения в процессе силанизирования. Например, из глутаминовой и 2,4-диамино-масляной кислот образуются циклические продукты<sup>114</sup>, а производные  $\omega$  и  $\alpha, \omega$ -АК выходят из колонки в виде двух пиков с различным количеством ТМС-групп в молекуле.

Как и эфир-ацильные производные, ТМС АК можно готовить в герметично закрытых золотых капсулах с последующим вводом этих капсул в хроматограф автоматическим дозатором.

Сравнивая методики анализа белковых АК в виде ТМС и эфир-ацильных производных, можно отметить, что время разделения меньше в два раза для эфир-ацильных производных. Несомненным преимуществом ТМС АК является одностадийность их получения, но длительность силанизирования намного больше, чем у операций этерификации и ацилирования. Кроме того, ТМС-производные несколько менее стабильны, чем эфир-ацильные; трудно силанизируется аргинин, а при получении эфир-ацильных производных плохо реагирует гистидин и триптофан; сочетание этих двух методов позволяет более надежно определять состав смеси АК. Для детектирования ТМС АК обычно используют ПИД и ТИД с порогом обнаружения  $\sim 10^{-9}$  г.

Разделение ТМС сульфо- и селено-АК, необходимых для рационального питания животных, достигается при использовании колонок с силиконовым эластомером SE-30: при 117° разделены производные цистеина, метионина и их серу- и селенсодержащих аналогов<sup>115</sup>. Отмечено, что селенсодержащие АК разлагаются при нагревании с БСА, поэтому для их силанизирования использовали реагент «трисил». При силанизировании цистеина, цистина, гомоцистина, цистеиновой кислоты и L-2-тиогистидина наблюдается появление темноокрашенных продуктов вследствие окисления.

Исследованы также ТМС-эфирные производные АК<sup>115</sup>: силанизированные *n*-бутиловые эфиры 20 белковых АК разделены за 32 мин на стеклянной колонке, содержащей стеклянные шарики с 0,2% OV-17, температура от 90 до 225°, при этом цистеин выходит вместе с гидрокси-пролином. Однако появление еще одной дополнительной стадии — этерификации — не может быть признано целесообразным для аналитической работы.

Вследствие трудности получения ТМС-производных и их невысокой стабильности продолжаются поиски новых путей мягкого получения летучих производных АК. Предлагается<sup>116</sup> хлоргидраты метиловых эфиров АК обрабатывать содой, изомасляным альдегидом и бисульфитом с последующим восстановлением — при этом образуются стабильные эфиры, устойчивые к гидролизу. Предлагают также<sup>117, 118</sup> непосредственно вводить ТФА АК в негретую зону дозатора хроматографа: при этом образуются летучие оксазолин-5-оны. На колонке с ПЭГА, нанесенным на хромосорб W HP, при программировании температуры от 40 до 140° разделены 11 оксазолинов АК первой и второй групп. Исследовано разделение *n*-цианэтиловых и *n*-цианбутиловых эфиров АК<sup>119</sup>. Для одностадийного получения летучих производных АК использована смесь диметилфорамида с диалкилацеталем и 1,3-дихлортетрафторацетоном<sup>120</sup>. Этот реагент алкилирует карбоксильную группу и конденсируется с аминной; однако оксигруппы не вступают в реакцию и требуют дополнительного ацилирования. Общее время реакции — около одного часа, причем наибольшие трудности отмечаются для получения производного аспарагина.

Весьма перспективно использование галогенацетонов для получения летучих производных АК. В последнее время<sup>151</sup> подобраны условия

быстрого получения летучих производных АК этим методом: конденсация с дихлортетрафторацетоном с образованием циклической структуры проходит в слабощелочной среде при комнатной температуре за несколько минут; оксигруппы, а также  $\omega$ -аминогруппы необходимо ацилировать. Эти производные стабильны в течение нескольких месяцев, а ацилированные производные — лишь несколько недель (при хранении при 4°). Для разделения производных использована колонка длиной 1,8 м с 5% силиконового эластомера SE-30 и с программированием температуры от 150 до 230°; удовлетворительно разделение достигается и при использовании силиконового масла OV-17<sup>122</sup>. Эти методики использованы для определения подсодержащих АК.

Предложено<sup>123</sup> определять триптофан в виде ТМС-производного 2,3,4,5-тетрагидро-S-каболин-4-карбоновой кислоты на силиконовом эластомере SE-30. Метиловые эфиры N-изобутилоксикарбонил-АК (белковые АК, кроме аргинина) разделены на колонке, содержащей 0,7% смешанной неподвижной фазы (поли-A-101A, поли-A-10B, FFAP в соотношении 3:3:1)<sup>124</sup>.

Из приведенного обзора различных способов получения летучих производных АК видно, что еще нет достаточно удобного одностадийного метода получения таких производных; однако развитие ряда методов, например циклизации, позволит, по-видимому, в недалеком будущем получить стабильные летучие производные.

### III. РАЗДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ АК

Для разделения оптических изомеров используются главным образом два метода: а) получают производные АК с оптически активными реагентами и разделяют их на обычных неподвижных фазах и б) летучие производные АК, полученные без применения оптически активных реагентов, разделяют на оптически активной неподвижной фазе. Необходимым условием разделения оптических изомеров АК методом ГЖХ оказалось наличие или в молекуле сорбата или в молекуле неподвижной фазы по крайней мере двух асимметрических атомов углерода. Это правило позволяет разделять производные окси-АК на обычных неподвижных фазах<sup>18</sup>, так как молекулы таких АК содержат два оптически активных атома углерода.

#### 1. Разделение на оптически неактивной неподвижной фазе

В качестве реагента может быть использован любой оптически активный спирт, например *втор*-бутанол и его гомологи. Этерификацию проводят в течение часа при 100° в 4—8N растворе хлористого водорода в спирте. Эфиры вторичных спиртов и АК первой группы, включая аспарагин, лизин, глутамин и гидроксипролин, ацилированные ТФУА, разделены на капиллярной колонке длиной 50 м с полипропилен-гликолем или фторсиликоновым маслом FS-1265<sup>125, 126</sup>. Оптические изомеры производных октанола-2 разделяются лучше, чем производные бутанола-2, однако первые обладают меньшей листучестью, а АК плохо растворяются во *втор*-бутаноле. Оптические изомеры *втор*-бутиловых эфиров N-ТФА белковых АК, за исключением гистидина, аргинина, цистеина, разделены на капиллярной колонке с ПЭГ или юконом LB-550X<sup>127, 128</sup>. На колонке длиной 1,8 м, заполненной носителем с 0,65% ПЭГА, при программировании температуры от 80 до 215° частично разделены оптические изомеры смеси аланина, валина, лейцина, треонина, серина, цистеина, фенилаланина и тирозина в виде *втор*-бутиловых эфиров N-ТФА. Все эти соединения вместе с изолейцином, пролином и

метионином в <sup>129</sup> разделены при таком же температурном режиме, но с пониженным содержанием ПЭГА на носителе—0,32%. Для лизина и орнитина не наблюдалось расщепления пиков на оптические активные компоненты. Полное время разделения изомеров 17 АК составило 80 мин. Использование сорбентов с небольшим количеством неподвижной фазы вызывает те же возражения, что и при разделении эфир-ацильных производных АК.

Авторы работ <sup>129–133</sup> считают более целесообразным газохроматографическое разделение оптических изомеров АК в виде эфиров втор-амилового и втор-бутилового спиртов. Исследовано влияние строения спиртов на разделение оптических изомеров АК на примере фенилаланина <sup>134</sup>: увеличение соотношения длины радикалов, присоединенных к асимметрическому атому в эфире, улучшает разделение изомеров; этому же способствует удаление разветвления углеродной цепи от оптически активного атома углерода. Наилучшее разделение получено с эфирами 3,3-диметилбутанола-2, что положено <sup>135</sup> в основу методик разделения оптических изомеров 16 АК (аргинин, гистидин и цистеин не изучались). Летучие производные этих АК разделены на колонке длиной 3 м, заполненной хромосорбом W с 10% силиконового масла OV-17. Использованы также эфиры других спиртов: пентанола-2 для разделения изомеров валина, метиловые эфиры<sup>2</sup>, трет-бутилоксикарбонильные производные, обработанные (D)-4-метил-2-амиламидами <sup>18</sup>.

Эфиры вторичных спиртов C<sub>5</sub>—C<sub>8</sub> и ацильные производные ТФУА, пентафтторпропионового ангидрида, гептафтормасляного ангидрида исследованы в <sup>130</sup> для определения оптимальных условий газохроматографического разделения изомеров АК. Оптические изомеры аспарагина (N-ТФА-3,3-диметил-втор-бутиловый эфир и N-перфторбензол-втор-бутиловый эфир) разделены на капиллярной колонке длиной 50 м с юконом LB-550X <sup>136–141</sup> и с ПЭГ <sup>128</sup>.

Другим направлением в получении оптически активных летучих производных АК является ацилирование оптически активными агентами. В качестве последних использованы карбонилхлориды:  $\alpha$ -хлорпропионил- <sup>136, 142, 143</sup>,  $\alpha$ -бромпропионил- <sup>144</sup>,  $\alpha$ -хлорацил- <sup>142, 143</sup>, N-ТФА-тиазолин-4-карбонил <sup>145</sup> и N-ТФА-пролил <sup>146–152</sup>. Изучена применимость хлоридов различных  $\alpha$ -хлоркарбоновых кислот для ацилирования АК <sup>143–153</sup>, показано, что при использовании полярной неподвижной фазы достигается наилучшее разделение изомеров. Для разделения оптических изомеров фенилаланина на капиллярной колонке длиной 46 м с полипропиленгликолем или силиконовым маслом ХЕ-60 <sup>154</sup> оказались оптимальными  $\alpha$ -бромпропионовые производные АК; однако авторы отмечают затруднения с синтезом оптически чистого реагента. В аналитической практике наиболее широко используется ацилирование метиловых эфиров АК N-ТФА-L (или D-) пролилхлоридом; этот реагент готовится обработкой L-пролина тионилхлоридом <sup>146</sup>. Хотя синтез проводится в весьма мягких условиях, однако не исключена рацемизация продукта <sup>147</sup>. В работе <sup>147</sup> предложены меры по контролю отдельных стадий синтеза для предотвращения рацемизации.

Следовательно, оптически активные летучие производные АК для их последующего разделения методом ГЖХ можно получать либо этерификацией оптически активными спиртами, либо ацилированием оптически активными агентами. В первом случае, как правило (ввиду небольшого различия в удерживании оптических изомеров), используются только капиллярные колонки. Во втором случае различия в удерживании производных больше и их разделение обычно проводится на набивных колонках.

## 2. Разделение на оптически активных неподвижных фазах

Оптически активные неподвижные фазы могут быть разбиты на три группы: а) уреиды, б) простые эфиры и в) дипептиды. Наибольшее аналитическое применение находят неподвижные фазы третьей группы.

Впервые разделение оптически активных изомеров АК осуществлено в виде их N-ТФА-*L*-пролилпроизводных на оптически активной неподвижной фазе<sup>146, 154, 155</sup>; в дальнейшем показано, что наилучшей неподвижной фазой является циклогексиловый эфир N-ТФА-*L*-валил-*L*-валина<sup>156-158</sup>. Верхний температурный предел использования этой неподвижной фазы составляет 110°; при использовании такого же эфира N-ТФА-*L*-фенилаланин-*L*-лейцина этот предел возрастает на 10°<sup>159, 160</sup>. По некоторым данным<sup>161-165</sup> последняя неподвижная фаза сохраняет свою работоспособность до 140°, причем использование перфторпропионилизопропиловых производных АК позволяет значительно снизить времена удерживания. На короткой (30 м) и длинной (120 м) капиллярных колонках разделены смеси оптических изомеров 17 АК при температурах от 110 до 125° в изотермическом режиме<sup>156-160</sup>.

Высказано предположение, что причиной разделения производных оптических изомеров АК на оптически активной неподвижной фазе является возникновение тройных водородных связей между молекулами взаимодействующих веществ, причем стерические препятствия для возникновения водородных связей минимальны, если сорбат и сорбент относятся к одному и тому же оптическому классу. Избирательность неподвижных фаз возрастает при использовании эфиров спиртов с разветвленными радикалами. При сравнении разделительных свойств циклогексиловых эфиров N-ТФА-*L*-валин-*L*-валина и N-ТФА-*L*-валил-*D,L*-валина оказалось, что лучшие результаты получаются при использовании последней неподвижной фазы<sup>168</sup>.

Ощутимым недостатком оптически активных неподвижных фаз служит их невысокая термостабильность: максимальная температура использования трипептидов не превышает 120°, а твердые полипептиды, устойчивые до 200°, неспособны разделять оптически активные изомеры<sup>18</sup>. Обнаружено<sup>169, 170</sup>, что если представить формулу производного АК как CF<sub>3</sub>—CO—NH—CHR—CO<sub>2</sub>R', то для достижения максимальной изомерной избирательности необходимо, чтобы было R>COOR'.

Поскольку различия в удерживании оптических изомеров невелики, предпочтительнее использовать капиллярные колонки. Например, изобутиловые эфиры N-ТФА АК разделены на дипептидной оптически активной неподвижной фазе в капиллярной колонке длиной 120 м; при времени разделения 70 мин не достигнуто полного разделения изомеров аланина, валина, треонина, изолейцина, серина и лейцина; изомеры тирозина и аргинина разделяются на короткой колонке длиной 12 м<sup>159</sup>. Изопропиловые эфиры N-ТФА АК разделены на капиллярных колонках длиной от 30 до 150 м с циклогексиловым эфиром N-ТФА-*L*-валил-*L*-валина<sup>108</sup>; на циклогексиловом эфире N-ТФА-*L*-валил-*L*-лейцина при 110° разделены смеси изомеров валина, аланина, треонина, изолейцина, лейцина, пролина за 130 мин при длине колонки 30 м<sup>167</sup>. На колонке длиной 120 м при 100° с циклогексиловым эфиром N-ТФА-*L*- $\alpha$ -амино-масляной кислоты разделена смесь изомеров изопропиловых эфиров N-ТФА аланина, валина, теронина, изолейцина, лейцина, серина, пролина и глицина<sup>136</sup>. Описано также разделение оптических изомеров изопропиловых эфиров N-ТФА АК на стеклянной колонке при 110° на N-трифторацетилциклогексиловом эфире *L*-валил-валина<sup>171</sup>, что было использовано для ряда прикладных исследований<sup>18</sup>.

Каждый из описанных методов определения оптически активных изомеров АК имеет свои преимущества. Однако первый метод требует высокой оптической чистоты реагентов, а для разделения эфиров разветвленных спиртов и АК необходимо обеспечить высокую эффективность колонки. Второй метод не требует высокой оптической чистоты неподвижной фазы, но его возможности ограничены невысокой предельной температурой использования таких неподвижных фаз.

#### IV. РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ

Для экранирования активных групп в пептидах используются те же методы, что и для АК, а термостойкость полученных производных лимитируется температурой разрыва пептидных связей (в интервале от 200 до 250°).

Возможности газохроматографического разделения пептидов в виде их летучих производных интересны с двух точек зрения: а) насколько большие полимерные молекулы обладают нужной для газохроматографического разделения летучестью и б) какую разделительную способность может обеспечить хроматографическая колонка при разделении всех возможных дипептидов (для белковых АК возможно 400 дипептидов). При восстановлении пептидов алюмогидридом лития получают полиаминоспирты, которые разделяют на колонке с 8% аниезона L. Таким способом разделены смеси ди-, три- и тетрапептидов<sup>18, 160</sup>. Описано получение метиловых эфиров N-ТФА пента- и гексапептидов и, наконец, сообщается о летучих производных пептидов, содержащих до 12 АК<sup>172</sup>. Термостойкость пептидов во многом определяется природой мономерных звеньев и поэтому не все три- и более высокие полипептиды могут быть проанализированы методом ГЖХ. Получение летучих производных этих веществ описано в работах<sup>173-178</sup>.

Метиловые эфиры N-ТФА дипептидов разделены при 180—220°, а те же производные трипептидов — при 250°<sup>18</sup>. Газохроматографическое разделение эфиров ацетатов, ацетилтриметокси-ТФА и пентафторпропионатов 37 дипептидов исследовано на различных неподвижных фазах<sup>179</sup>. Обычно разделение дипептидов в виде их эфиров N-ТФА проводится методом высокотемпературной ГЖХ с небольшим количеством неподвижной фазы на носителе и при программировании температуры. Пептиды, содержащие аргинин, с трудом образуют летучие производные; в ряде случаев инертность поверхности твердого носителя играет решающую роль при разделении летучих производных дипептидов; первые пробы хемосорбируются и для получения количественной информации необходимо предварительно вводить в колонку 3—4 пробы.

Весьма перспективным представляется сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии для определения состава ди- и полипептидов. В отличие от жидкостной хроматографии высокая эффективность ГЖХ позволяет разделять многие изомерные соединения и устанавливать затем их структуру методом масс-спектрометрии; более того, отбирая выходящие из колонки отдельные части хроматографических зон, можно с помощью масс-спектрометра установить наличие в них неразделенных соединений.

Приведенные данные указывают на большие возможности газохроматографического метода при разделении пептидов с числом мономерных звеньев в молекуле до 12. Особенно многообещающие при анализе пептидов сочетание ЖХВД и ГЖХ, которые во многих отношениях дополняют друг друга.

## V. ПРИМЕНЕНИЕ ПИРОЛИТИЧЕСКОЙ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Принцип метода пиролитической газовой хроматографии (ПГХ) состоит в практически мгновенном разложении микропробы (0,1—1 мг) вещества при контролируемой температуре. При этом наблюдаются только продукты первичных реакций распада молекулы, позволяющие однозначно определять ее состав. Это — качественный метод, пригодный в основном для идентификации одного соединения или для установления его структуры.

В начале обзора упомянуты работы, где летучие производные АК получали нагреванием до 300°. Использование более высоких температур в условиях ПГХ позволяет получать характерные спектры продуктов разложения (пиrogramмы)<sup>180—182</sup>. Например, при пиролизе на нагретой докрасна платиновой спирали и при использовании разделительной колонки со скваланом обнаружен<sup>183</sup> ряд характерных пиков для фенилаланина и аланина. Однако этот метод пиролиза при отсутствии контроля температуры спирали не универсален: гистидин, триптофан и тирозин не образуют летучих продуктов, а примерно половина всех белковых АК не дают характерных пиrogramм. Только применение пиролизеров со строго контролируемой температурой (например, с нагревателями из ферромагнетиков с определенной точкой Кюри или с электронным контролем температуры спирали) позволило получить характерные пиrogramмы для АК. Пиролиз белковых АК при 700° с расшифровкой продуктов пиролиза на масс-спектрометре позволяет получить характерные пиrogramмы, причем показано, что основными продуктами разложения АК являются нитрилы<sup>184—187</sup>.

Снижение температуры пиролиза и применение колонки длиной 2,4 м с 5% 1,2,3-три(2-цианэтокси)пропана при программировании температуры от —180 до 125° позволило получить иной состав продуктов пиролиза<sup>188—189</sup>. В этой же работе показано, что спектры пиролиза 10 различных дипептидов представляют собой сочетание характерных пиrogramм для входящих в их состав АК.

Исследование пиролиза эквимолекулярных смесей АК при 850° в атмосфере азота<sup>190—192</sup> указывает на заметное снижение количества ароматических углеводородов в продуктах пиролиза при добавлении к АК, содержащим ароматические ядра, неароматических АК. Однако этот факт не препятствует качественным определениям, так как изменяется лишь соотношение продуктов распада, но характерные пики пиrogramм не исчезают. Следовательно, пиролиз пептидов позволяет получить сведения об их АК-составе, причем температура пиролиза может быть как низкой (300°), так и высокой (около 800°), а состав продуктов зависит от температуры процесса<sup>193—196</sup>.

Определение продуктов пиролиза интересно и для изучения механизма термического распада биополимеров. Этому посвящен ряд работ<sup>197—199</sup>, где продукты пиролиза, проведенного при 500°, идентифицировались с помощью масс-спектрометра, а разделение проводилось на полимерном сорбенте тенакс с программированием температуры от 25 до 285°. При этих температурах алифатические АК декарбоксилируются, образуя амины и ряд других соединений; параллельно с декарбоксилированием протекает реакция конденсации АК с превращением их в дипептиды и последующим образованием соответствующего дикетопиперазина. Теряя аммиак, β-АК превращаются в ненасыщенные кислоты, в то время как γ- и ω-АК образуют при пиролизе соответственно 2-пиролидоны и 2-пиперилоны. Доказательством такого механизма служит обнаружение больших количеств цианистого водорода в

продуктах пиролиза как следствие протекания реакций циклизации<sup>197</sup>. Поскольку дикетопиперазины обладают достаточно высокой летучестью, интересно использовать их как летучие производные дипептидов для газохроматографического анализа. Так, продукты пиролиза дипептидов при 400° разделены на колонке с 5% силиконовой жидкости OV-17 при 240°<sup>198</sup>. Ограничением дикетопиперазинного метода служит необходимость реакции конденсации АК (при определении индивидуальных АК). Для этого используется, например, нагревание метиловых эфиров АК в расплавленном феноле при 150°<sup>192</sup>. Силанизирование продуктов пиролиза БСА при 80° за 10 мин позволяет резко сократить время анализа и улучшить симметрию пиков, что устраниет трудности определения дикетопиперазинов в<sup>19</sup>.

Метод ПГХ использован для установления последовательности АК в молекулах пептидов: вначале проводят пиролиз исходного пептида, затем отщепляют концевую АК и вновь проводят пиролиз продукта; при сравнении пирограмм исходного пептида и пептида после отщепления концевой АК можно определить концевую АК<sup>200</sup>. Этот метод был использован для определения первичной структуры белков в четырех актиномицинах<sup>198</sup>. Методом ПГХ изучен ряд фенилтиогидантонов АК<sup>201</sup>.

При температурах пиролиза 800° получены пирограммы белков и нуклеиновых кислот, причем хотя белки и нуклеиновые кислоты дают одинаковые по количеству характерных пиков пирограммы, соотношение отдельных характерных пиков может быть использовано для идентификации макромолекул. Такое определение белков и нуклеиновых кислот значительно упрощается при использовании ТИД, чувствительного к азоту; пирограммы содержат всего 6 характерных пиков, по соотношению высот которых идентифицируется исследуемая молекула. Кроме того, ПГХ оказалась весьма эффективным средством для таксономии белков, нуклеиновых кислот, отдельных клеток, вирусов и т. п.; ПГХ в сочетании с масс-спектрометрией широко используется для изучения природы биополимеров<sup>18</sup>.

## VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АК В БЕЛКАХ

Для установления первичной структуры молекул белка разработан ряд методов последовательного отщепления концевых АК. Методом ПГХ можно определить АК-состав белков, однако последовательность АК в белках может быть изучена лишь при использовании мягких методов воздействия. За один прием можно определить от двух до пяти последовательно соединенных АК; если учесть, что молекулярный вес белков достигает нескольких миллионов, то очевидна трудоемкость операции определения первичной структуры белка.

Из ряда методик отщепления наибольшее распространение получила методика Эдмана<sup>18</sup>, где исходное вещество обрабатывается фенилизотиоцианатом и затем концевая группа отщепляется в солянокислой среде; конечным продуктом является фенилтиогидантон (ФТГ), бициклическая молекула которого содержит иминогруппу, карбонильную группу и радикал исходной АК. Отсутствие карбоксильной группы в ФТГ АК повышает летучесть производного, а наличие бензольного кольца весьма полезно для метода ЖХВД, где используется УФ-детектор. После каждой элементарной операции получается ФТГ только одной АК, поэтому задача ГЖХ-анализа — установление природы ФТГ АК по данным удерживания. Требования к аналитической методике повышаются, если необходимо в одной пробе определять продукты 2—5 стадий отщепления без отмычки.

По летучести ФТГ АК можно разделить на три группы: а) аспарагин, глутамин, цистеин обладают низкой летучестью, для их газохроматографического определения необходима силанизация; б) серин, треонин и гистидин обладают умеренной летучестью, силанизация желательна и в) силанизация остальных ФТГ АК заметно не изменяет их летучести. Силанизация ФТГ АК осуществляется при 50° за 10 мин смесью БСТФА с ацетонитрилом (1:1) с добавкой пиридина<sup>202</sup>.

Впервые разделение ФТГ АК описано в<sup>176, 203</sup>, при этом были отмечены значительные трудности в анализе ФТГ серина, треонина, тирозина и окси-АК. Разделение 18 ФТГ АК описано в<sup>204</sup>, для увеличения летучести производных использовали силанизацию<sup>205</sup>. Эти методики использованы для определения последовательности АК в белках<sup>18</sup>.

Достаточно подробное описание методики анализа ФТГ АК содержится в работе<sup>206</sup>. Так же как и в случае эфиров АК, здесь необходимо избегать контакта ФТГ АК с нагретыми металлическими поверхностями. Авторы рекомендуют силанизировать ФТГ АК непосредственно в колонке путем последовательного впрыскивания силанизирующего агента; однако в этих условиях не все ФТГ АК вступают в реакцию, в частности, целесообразно ФТГ аспарагина, цистеина и глутамина силанизировать перед вводом пробы, а ФТГ лизина и S-карбоксиметилцистеина силанизируются весьма трудно. ТМС ФТГ аспарагина, глутамина и цистеина заметно адсорбируются носителем, а летучесть ФТГ тирозина и триптофана невелика. Разделение смеси производных достигается на смешанной неподвижной фазе (11% SP-400, 8% силиконовой жидкости OV-210 и 1% OV-225) при программировании температуры от 165 до 270°, длина колонки 1,2 м; полное разделение отмечается для 13 ФТГ АК. Для надежности идентификации пробы анализируется дважды: исходная смесь и продукты силанизирования. Хотя в колонке частично разлагаются ФТГ серина, треонина, гистидина, глутамина, аспарагина и лизина, для качественного анализа это не играет роли. Общее время разделения 40—50 мин.

ТМС ФТГ белковых АК частично разделены на колонке длиной 3,25 м, содержащей 5% силиконовой жидкости OV-17 и 1% дексила 300<sup>207</sup>. На капиллярной колонке длиной 4,5 м и диаметром 0,13 мм со смесью силиконовых жидкостей OV-101 и OV-225 разделены 19 из 20 ТМС ФТГ АК, причем ФТГ гистидина выделяется лишь при повышенных температурах, цистеин превращали в цистин, аргинин — в орнитин<sup>208</sup>. Особые трудности вызывает анализ ТМС ФТГ аргинина — ни на одной неподвижной фазе не удалось добиться выхода этого производного. Пик ФТГ аргинина выходит лишь после ацилирования производного смесью уксусного ангидрида с пиридином (4:1) при 100° в течение 5 мин<sup>209</sup>; ацилирование может проводиться и при непосредственном вводе пробы ФТГ АК с уксусным ангидридом в нагретый дозатор хроматографа. Такие производные использованы для установления структуры молекул ряда белков<sup>18</sup>.

Летучие производные ФТГ АК получены также при обработке белков перфторфенилизоцианатом<sup>210</sup>. Эти производные белковых АК, кроме аргинина и гистидина, разделены на колонке длиной 1,2 м, заполненной хромосорбом W с 10% силиконовой жидкости DC-500 и 2% OV-25, при программировании температуры от 160 до 240°.

Чувствительность и селективность газохроматографического определения ФТГ АК значительно повышаются при использовании пламенно-фотометрического детектора (ПФД), фиксирующего только соединения, молекулы которых содержат атомы серы. Это позволяет последовательно анализировать суммарные фракции отщепления концевых АК без

отмывки продуктов после каждой стадии. Чувствительность определения —  $10^{-9}$  г ФТГ АК.

Для определения последовательности АК в белках используют также и метилтиогидантонины (МТГ), при этом процесс секвенации упрощается, а более высокая летучесть МТГ по сравнению с ФТГ благоприятствует их газохроматографическому разделению. В данном случае силанизирование не обязательно, по крайней мере для 16 МТГ АК, которые могут быть разделены на двух колонках: с силиконовым эластомером SE-30 и силиконовой жидкостью OV-17<sup>211</sup>. Пять остальных МТГ АК — аспарагина, серина, аргинина и цистина — определяются только после силанизирования, причем этот процесс проходит так же, как и для ФТГ АК<sup>207, 212</sup>. Рекомендуется<sup>213</sup> силанизировать производные раствором БСА в ацетонитриле при 20° в течение 5 мин; найдено, что выход эфира гистидина увеличивается вдвое при вводе пробы с избытком БСА. Для полноты реакции повышают температуру до 100° и увеличивают экспозицию до 10 мин<sup>214, 215</sup>. Описано<sup>208</sup> разделение 19 МТГ АК за 55 мин на стеклянной капиллярной колонке длиной 4,5 м, заполненной смешанной неподвижной фазой (95% силиконовой жидкости OV-101 и 5% OV-225) при программировании температуры от 120 до 280°. Исходные вещества обрабатывали смесью БСТФА с 2% ТМХС, при этом ряд МТГ АК образует дизамещенные производные; МТГ аргинина определить не удалось. Оптимальный режим разделения МТГ АК (исключая аргинин) такой<sup>214, 215</sup>: колонка длиной 1,65 м заполнена газ-хромом Q с 2% силиконовой жидкости OV-17, температура программируется от 145 до 230°, время определения — 45 мин. Дополнительное разделение пары МТГ аспарагина и фенилаланина требует 4,5 мин.

Наибольшие трудности возникают при силировании МТГ аргинина и гистидина, поэтому рекомендуется экстрагировать эти МТГ этил-ацетатом, затем силанизировать и разделять их отдельно<sup>204</sup>.

Кроме указанных методов, для определения первичной структуры белков используют 2,4-динитрофенильные (ДНФ) производные АК<sup>18</sup>. Метиловые эфиры ДНФ 13 АК разделены на четырехметровой колонке с 1,5% силиконового эластомера SE-30 при программировании температуры от 170 до 230°<sup>216</sup>; производные треонина и серина не разделены. Эта методика использована для определения последовательности АК в белках малформина А и грамицидина А<sup>18</sup>.

## VII. НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ ГЖХ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ АК В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ И ГЕОЛОГИИ

При анализе биологических сред возникают определенные трудности, связанные с подготовкой пробы и удалением мешающих анализу примесей. Наиболее удобная методика<sup>35</sup> газохроматографического анализа гидролизата белков такова. Вначале из пробы ультразвуком удаляется воздух, который мешает определению метионина и цистеина. Гидролиз белка осуществляется в среде 6 N соляной кислоты за 4 часа при температуре 145° (в то время как по обычной методике эта операция длится 18—24 час, причем триптофан, треонин, серин, тирозин, метионин и цистеин частично разлагаются, а связи с валином и лейцином гидролизуются не полностью). При помощи ионообменной смолы из гидролизата удаляются неорганические кислоты, остаток сушится, этерифицируется и ацилируется. Так был определен АК-состав рибонуклеазы, белка зерен, рыбы; отмечается хорошее совпадение результатов анализа с полученным и другими методами.

При анализе гидролизатов белков используют<sup>217-219</sup> изопропиловые эфиры N-ацетил-АК, причем для уменьшения гидролиза к исходной смеси добавляют 2,2-диметоксипропан. Порог обнаружения АК —  $5 \cdot 10^{-8}$  г. Метод ГЖХ использован для анализа АК-состава разнообразных белков, в частности ископаемых животных, почвы и антибиотиков<sup>18</sup>.

Кроме того, с помощью ГЖХ можно определять свободные АК в различных средах. Рекомендуется<sup>33, 34</sup> 0,1—0,4 мл плазмы денатурировать четырьмя объемами насыщенного раствора пикриновой кислоты, раствор центрифугировать, а фильтрат пропустить через колонку с ионообменной смолой (колонка промывается вначале водой, а затем раствором аммиака). Высказываются мнения<sup>220, 221</sup>, что описанный метод непригоден для аргинина и лизина, поэтому предлагают добавлять уксусную кислоту: 0,1 мл плазмы разбавляется 10 объемами 1 N уксусной кислоты и пропускается через ионообменную колонку, откуда АК вымываются водой и раствором аммиака; часть АК при этом теряется.

Разделение гистидина, гистамина, N-метилгистамина и N-диметилгистаминов в виде ТМС-производных и эфиров ТФУА и ГФМА достигнуто с применением силиконовой жидкости OV-17<sup>222</sup>. Метиловые эфиры N-нитрозопроизводных пролина, саркозина и пинаколиновой кислоты разделены при 180° на колонке с диэтиленгликольсукинатом<sup>223</sup>.

Широко используются ТМС-производные для анализа продуктов растительного происхождения и гормонов<sup>18</sup>.

Исключительно высокая чувствительность газохроматографического метода позволяет использовать покомпонентное определение АК в микроколичествах на различных материалах, а также в предметах внеземного происхождения<sup>224</sup>.

### VIII. РАЗДЕЛЕНИЕ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, НУКЛЕОЗИДОВ И НУКЛЕОТИДОВ

В состав нуклеиновых кислот (НК) входят гетероциклические основания — пурины и пириимины. Содержащаяся в них карбонильная группа легко переходит в енольную, что служит причиной возникновения сильных водородных связей и соответствующего понижения летучести веществ. Получение летучих производных оснований НК осуществляется в основном силанизированием.

Первые работы по разделению методом ГЖХ метилированных производных аденоцина и урицина появились в 1964 г.<sup>225, 226</sup>. Лучшие результаты получены с силанизированными производными этих соединений<sup>227</sup>. Среди ранних работ следует отметить попытки разделения оснований НК в виде триацетатов<sup>228</sup>. Разделение ТМС-производных аденоцина, цитицина, аденоцин-5'-сульфата, аденоцин-5'-монопропионата, 5'-аденоцинмонофосфата, 2'-аденоцинмонофосфата, 3'-аденоцинмонофосфата и НАД (никотинамидадениндинуклеотида) осуществлено<sup>15</sup> на колонке с силиконовым эластомером SE-30 в интервале температур от 228 до 249°; показано<sup>229, 230</sup>, что при силанизировании могут образоваться несколько производных с различным количеством ТМС групп при атоме азота аминогруппы. При обработке пяти оснований НК БСА при 150° в течение 45 мин количественно образуются ТМС-производные; БСТФА реагирует в тех же условиях и пик реагента более четко отделяется от целевых продуктов. Разделение ТМС-производных НК осуществлено на колонке длиной 1 м с 4% силиконового эластомера SE-30 при программировании температуры от 95 до 230° за 24 мин; определяются также ксантин, 5-метилинозин и гипоксантин<sup>212</sup>. Мини-

мально обнаруживаемое количество оснований НК —  $3-5 \cdot 10^{-9}$  г. При таких же условиях разделена смесь уридина, инозина, аденоцина, ксантоцина и цитидина с ошибкой определения 3%; цитизин дает два пика, а при силировании аденоцина образуются небольшие количества тетра-ТМС-производного<sup>229</sup>.

При силанизировании тимина предлагается<sup>231</sup> дезактивировать избыток силирующего агента метанолом и удалять вещества, способствующие гидролизу, в вакууме. При газохроматографическом определении ТМС-производных гуанозина и аденоцина рекомендовано<sup>175</sup> вначале получать метоксильные производные, а затем их силанизировать. Получены БСТФА ряда минорных нуклеозидов, эти производные разделены методом ГЖХ<sup>230</sup>. Проведено<sup>232</sup> обширное исследование газохроматографического поведения ТМС-производных 32 нуклеозидов с использованием двух силиконовых неподвижных фаз — OV-17 и SE-30.

Газохроматографические методики анализа оснований НК и нуклеозидов широко используются в аналитической практике<sup>19, 233-236</sup>.

Описана<sup>56</sup> методика газохроматографического исследования гидролизата РНК и ДНК на трех уровнях: макро- (проба —  $10^{-3}$  мг), полу-микро- (проба —  $10^{-4}$  г) и полуколичественный анализа при пробе  $5 \cdot 10^{-7}$  г. Гидролизат очищается от перхлоратов, фосфатов и других неорганических ионов на ионообменной колонке; на ней же удаляется рибоза, мешающая определению. Данные газохроматографического анализа хорошо совпадают с результатами других методов.

Обычно для анализа оснований НК используют сочетание тонко слойной хроматографии со спектрофотометрией; при этом получают полуколичественные данные с пределом обнаружения  $10^{-4}$  г, причем время определения значительно больше, чем методом ГЖХ. Использование электрофоретических методов позволяет обнаруживать до  $5 \cdot 10^{-5}$  г оснований НК<sup>18</sup>. Газохроматографическое определение оснований НК позволяет повысить чувствительность обнаружения на два порядка и провести разделение за короткое время — 24 мин; ощутимым недостатком ГЖХ является необходимость силирования исходных веществ и связанные с этим трудности.

Описано<sup>237-242</sup> определение фосфора в нуклеотидах и НК при силировании солей фосфатов ГМДС с ТХМС в среде пиридина при повышенных температурах. Производные получаются также при обработке исходного вещества 10—20-кратным избытком БСА или БСТФ и определяются на колонке длиной 1,8 м, содержащей силанизированный хромосорб W, пропитанный 5% силиконовой жидкости OV-101 при 155°<sup>243</sup>.

Последние достижения ГЖХ и ЖХВД в определении белков, НК и продуктов их распада позволяют сделать выводы о границах применения этих методов.

Анализ 20 белковых АК методом ГЖХ с учетом времени, идущего на приготовление пробы, занимает меньше времени, но производные для ЖХВД получаются более легко и более стабильны. Однако разделительная способность ГЖХ несравненно выше, чем у ЖХВД, поэтому при анализе смесей белковых и небелковых АК наиболее целесообразно использовать ГЖХ; более высокая разделительная способность ГЖХ позволяет также осуществить разделение оптических изомеров АК. Использование ГЖХ заметно снижает трудоемкость секвенирования по сравнению с ЖХВД.

Исключительно высокая чувствительность ГЖХ делает этот метод уникальным при анализе следов АК, а сочетание с масс-спектроскопией позволяет устанавливать структуру неизвестных АК и пептидов.

Возможности ГЖХ и ЖХВД в разделении оснований НК сравнимы, однако ГЖХ обладает большей чувствительностью. В таблице приведены сравнительные параметры ГЖХ и ЖХВД при анализе продуктов распада белков и НК; видно, что оба сравниваемых метода в значительной мере дополняют, но не исключают друг друга. Выбор нужного метода зависит от поставленных задач, квалификации исследователя и наличия необходимого оборудования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A. T. James, A. J. P. Martin, Biochem. J., **50**, 679 (1952).
2. J. R. Hunter, K. P. Dimick, J. W. Corse, Chem. Ind., **1956**, 294.
3. S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, Anal. Chem., **30**, 1185 (1958).
4. D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
5. P. B. Hamilton, Там же, **30**, 914 (1958); **35**, 2055 (1963).
6. P. B. Hamilton, D. C. Bouge, R. A. Anderson, Anal. Chem., **32**, 1782 (1960).
7. T. Hashidzume, U. Sasaki, Protein, Nucleic Acids, Enzyme, **13**, 735 (1968).
8. E. C. Horning, W. Vandenhout, Ann. Rev. Biochem., **32**, 709 (1963).
9. S. R. Lipsky, R. A. Landown, Ann. Rev. Biochem., **29**, 649 (1960).
10. B. Potteau, Bull. Soc. Chim. France, **1965**, 3747.
11. P. Neri, P. Tarli, Quand. sclavo diagn. diu. e lab., **5**, 1 (1969).
12. Z. E. Sikorski, Przem. spozywczy, **I9**, № 12, 19 (1965).
13. B. Weinstein, in Methods of Biochemical Analysis, ed. D. Glick, v. 14, N. Y., Wiley, 1966, p. 203.
14. Дж. Р. Коутлер, К. С. Хайн, в сб. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков, «Мир», М., 1974, стр. 85.
15. V. Marek, Chem. Listy, **68**, 250 (1974).
16. J. Rosmus, Z. Deyl, J. Chromatogr., **70**, 221 (1972).
17. V. Miller, V. Pacakova, Chem. listy, **67**, 1121 (1973).
18. P. Husek, K. Maček, J. Chromatogr., **113**, 139 (1975).
19. С. В. Бург, М. Б. Санторовская, Г. В. Аввакумов, В. М. Беликов, Успехи химии, **45**, 548 (1976).
20. Р. Кайзер, А. Прокс, в сб. Аминокислоты, пептиды и белки, ред. Т. Дэвени, Я. Герей, «Мир», М., 1976, стр. 115.
21. R. F. Coecard, P. Smith, J. Chromatogr., **61**, 329 (1971).
22. T. G. Clarke, N. A. Hampson, J. B. Lee, J. R. Morley, B. Scanton, J. Chem. Soc., **1970**, 815.
23. A. J. Cliffe, N. J. Berridge, D. R. Westgarth, J. Chromatogr., **78**, 333 (1973).
24. D. B. Lakings, C. W. Gehrke, J. Chromatogr., **62**, 347 (1971).
25. B. Halpern, V. A. Close, A. Wegmann, J. W. Westley, Tetrahedron Letters, **1968**, 3119.
26. B. Teuwissen, A. Darbre, J. Chromatogr., **49**, 298 (1970).
27. D. L. Stalling, C. W. Gehrke, Anal. Biochem., **18**, 118 (1967).
28. J. R. Coulter, C. S. Hahn, in New Techniques in Amino Acid Peptide and Protein Analysis, Ed. A. Niederwieser, G. Pataki, Ann Arbor Sci. Publ., Ann. Arbor, Michigan, 1971, p. 75.
29. S. R. Tannenbaum, W. G. Tilly, P. Issenberg, Anal. Chem., **40**, 1723 (1968).
30. R. E. Summons, W. E. Pereira, W. E. Reynolds, T. C. Rindfleish, A. M. Duffield, Там же, **46**, 582 (1974).
31. D. Roach, C. W. Gehrke, J. Chromatogr., **43**, 303 (1969).
32. P. Carcalon, J. D. Klingman, J. Chromatogr., Sci., **12**, 349 (1974).
33. C. W. Gehrke, K. Kuo, R. W. Zumwalt, J. Chromatogr., **57**, 209 (1971).
34. C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, K. Kuo, J. Agr. and Food Chem., **19**, 605 (1971).
35. F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, K. C. Kuo, J. Chromatogr., **94**, 113 (1974).
36. D. Roach, C. W. Gehrke, Там же, **44**, 269 (1969).
37. K. Blau, A. Darbre, Там же, **26**, 35 (1967).
38. R. H. Greeley, Там же, **88**, 228 (1974).
39. С. В. Шляников, М. Я. Карпейский, А. И. Якушина, Биохимия, **30**, 457 (1965).
40. S. C. Fu, D. S. H. Mak, J. Chromatogr., **78**, 211 (1973).
41. J. R. Coulter, C. S. Hahn, Там же, **36**, 42 (1968).
42. R. F. Adams, Там же, **95**, 189 (1974).
43. L. J. Everett, J. Graff, Amer. Lab., **3**, 51 (1971).
44. R. E. McGregor, G. M. Britten, M. S. Sharon, Clin. chim. acta, **48**, 65 (1973).
45. J. Metz, W. Ebert, H. Weicner, Chromatographia, **2**, 259 (1971).
46. J. Moodie, R. George, J. Chromatogr., **124**, 315 (1976).

47. J. Monjardino, Anal. Biochem., 21, 308 (1967).  
 48. M. Butler, A. Darbre, Biochem. Soc. Trans., 1, 610 (1973).  
 49. M. Greer, C. M. Williams, Anal. Biochem., 19, 40 (1967).  
 50. A. Islam, A. Darbre, J. Chromatogr., 43, 11 (1969).  
 51. E. Bayer, W. A. Koenig, J. Chromatogr., Sci., 7, 95 (1969).  
 52. A. J. Cliffe, N. J. Berridge, D. E. Westgarth, J. Chromatogr., 78, 333 (1973).  
 53. A. Islam, A. Darbre, Там же, 71, 223 (1972).  
 54. M. Butter, A. Darbre, Там же, 101, 51 (1974).  
 55. C. Hedcoth, M. Jocoban, Anal. Biochem., 25, 55 (1968).  
 56. D. L. Stalling, Ch. Gehrke, R. W. Zumwalt, Biochim. Biophys. Acta, 31, 616 (1968).  
 57. J. McArthur, J. Chromatogr., 99, 445 (1974).  
 58. Ch. W. Gehrke, D. Roach, R. W. Zumwalt, D. L. Stalling, L. L. Wall, Quantitative GLC of Amino Acids in Protein and Biological Substances, Columbia, Anal. Biochem. Lab., 1968.  
 59. J. Jönsson, J. Eyem, J. Sjöquist, Anal. Biochem., 51, 204 (1973).  
 60. C. W. Moss, M. A. Lambert, F. J. Diaz, Там же, 44, 458 (1971).  
 61. J. P. Zannetta, G. Vingendon, J. Chromatogr., 76, 91 (1973).  
 62. R. P. Collins, K. Kalnins, Pytton, 29, 89 (1972).  
 63. W. A. Koenig, W. Parr, H. C. Lichtenstein, E. Bayer, J. Oro, J. Chromatogr.  
 64. G. E. Pollock, L. H. Frommagen, Anal. Biochem., 24, 18 (1968).  
 65. H. Bober, Beckman Rept., 1973, № 2, 10.  
 66. Ch. W. Gehrke, D. L. Stalling, Separ. Sci., 2, 101 (1967).  
 67. Ch. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, L. L. Wall, J. Chromatogr., 37, 398 (1968).  
 68. Ch. W. Gehrke, K. Leimer, Там же, 53, 195 (1970).  
 69. H. H. Hediger, R. L. Stevens, H. Branderberger, K. Schmid, Biochem. J., 133, 551 (1973).  
 70. N. Lachovitzki, B. Björklund, Anal. Chem., 38, 446 (1970).  
 71. F. Marucci, F. Mussini, J. Chromatogr., 25, 11 (1966).  
 72. T. Bhatti, J. R. Clamp, Biochim. Biophys. Acta, 229, 293 (1971).  
 73. A. Darbre, K. Blau, J. Chromatogr., 29, 49 (1967).  
 74. D. L. Stalling, Ch. W. Gehrke, Biochem. Biophys. Res. Commun., 22, 329 (1966).  
 75. P. Morard, M. Garcia, I. P. Cabassy, Analisis, 3, 451 (1975).  
 76. M. Stefanovic, B. L. Walker, Anal. Chem., 39, 710 (1967).  
 77. E. D. Smith, F. M. Oathout, G. T. Cook, J. Chromatogr. Sci., 8, 291 (1970).  
 78. B. Thom, J. W. Parsons, J. Chromatogr., 90, 370 (1974).  
 79. A. Applequist, B. M. Nair, Там же, 124, 239 (1976).  
 80. Ch. W. Gehrke, H. Takeo, Там же, 76, 66 (1973).  
 81. W. A. Aue, Ch. W. Gehrke, R. C. Tindle, D. L. Stalling, C. D. Ruyle, J. Gas Chromatogr., 5, 381 (1967).  
 82. G. Erlingshausen, Ch. W. Gehrke, W. A. Aue, Separ. Sci., 2, 681 (1967).  
 83. R. W. Zumwalt, K. Kuo, Ch. W. Gehrke, J. Chromatogr., 57, 193 (1971).  
 84. J. M. L. Mee, C. C. Brooks, Там же, 62, 138 (1971).  
 85. B. Kolb, W. Hoser, Chromatographia, 6, 28 (1973).  
 86. C. W. Moss, M. A. Lambert, F. J. Diaz, Там же, 60, 134 (1971).  
 87. D. D. Clarke, S. Wilk, S. E. Gittlow, J. Gas Chromatogr., 4, 310 (1967).  
 88. G. E. Pollock, Anal. Chem., 39, 1194 (1967).  
 89. E. Anggard, G. Sedvall, Там же, 41, 1250 (1969).  
 90. S. L. McKenzie, T. Tenaschuk, J. Chromatogr., 97, 19 (1974).  
 91. C. W. Moss, M. A. Lambert, Anal. Biochem., 59, 259 (1974).  
 92. F. D. Ganchel, K. Beyermann, R. K. Zahn, Z. anal. Chem., 259, 177 (1972).  
 93. P. W. Albro, L. Fishbein, J. Chromatogr., 55, 297 (1971).  
 94. F. Sharokhi, Ch. W. Gehrke, Там же, 36, 31 (1968).  
 95. P. Tarli, S. Benocci, P. Neri, Farmaco Ed. prat., 25, 504 (1970).  
 96. L. Campos, M. Renard, M. Severin, Amer. Inst. Super. Agron., 31, 151 (1968—1970).  
 97. A. Daussin, R. Bourdo, Ann. biol. clin., 30, 417 (1972).  
 98. J. M. Gee, J. Chromatogr., 87, 155 (1973).  
 99. Ch. W. Gehrke, H. Takeo, Там же, 76, 77 (1973).  
 100. K. Rühlmann, J. pract. Chem., 4, 86, 515 (1959).  
 101. E. D. Smith, K. E. Sorrells, R. Q. Swinea, J. Chromatogr. Sci., 12, 101 (1974).  
 102. A. E. Pierce, Silylation of Organic Compounds, Pierce Chem. Co., Ill. 1968, p. 221.  
 103. E. D. Smith, K. L. Shewbart, J. Chromatogr. Sci., 7, 704 (1969).  
 104. L. Bikofer, M. Donike, 26, 270 (1967).  
 105. D. L. Stalling, Ch. W. Gehrke, R. M. Zumwalt, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 616 (1968).  
 106. E. D. Smith, J. M. Oathout, G. T. Cook, J. Chromatogr. Sci., 8, 291 (1970).  
 107. C. W. Gehrke, K. Leimer, J. Chromatogr., 90, 370 (1974).  
 108. C. W. Gehrke, H. Nakamoto, R. W. Zumwalt, Там же, 45, 24 (1969).  
 109. C. W. Gehrke, K. Leimer, Там же, 53, 201 (1970).  
 110. S. N. Alan, R. H. Hall, Anal. Biochem., 40, 424 (1971).

111. K. Bergström, J. Gütler, *J. Chromatogr.*, **26**, 481 (1967).
112. K. Bergström, J. Gütler, R. Blomstrand, *Anal. Biochem.*, **34**, 74 (1970).
113. R. L. Stern, B. L. Karger, W. J. Keane, H. C. Rose, *J. Chromatogr.*, **39**, 17 (1969).
114. K. Bergström, J. Gütler, *Acta Chem. Scand.*, **25**, 175 (1971).
115. K. A. Caldwell, A. L. Tappel, *J. Chromatogr.*, **32**, 635 (1968).
116. J. M. Davis, A. Furst, *Anal. Chem.*, **40**, 1910 (1968).
117. O. Grahl-Nielsen, E. Solheim, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1972**, 1092.
118. O. Grahl-Nielsen, E. Solheim, *J. Chromatogr.*, **69**, 366 (1972).
119. E. Jwamoto, S. Morimoto, *Nippon Kagaku Zasshi*, **85**, 341 (1964).
120. J. P. Thenot, E. C. Horning, *Anal. Letters*, **5**, 519 (1972).
121. P. Husek, *J. Chromatogr.*, **91**, 475 (1974).
122. O. Grahl-Nielsen, E. Solheim, *Anal. Chem.*, **47**, 333 (1975).
123. B. S. Middeditch, *Anal. Letters*, **8**, 397 (1975).
124. M. Makita, Sh. Yamamoto, M. Kono, K. Sakai, M. Shiraishi, *Chem. and Ind.*, **1975**, 355.
125. E. Gil-Av, R. Charles, G. Fischer, *J. Chromatogr.*, **17**, 408 (1965).
126. B. Halpern, J. W. Westley, *Austral. J. Chem.*, **19**, 1533 (1966).
127. G. E. Pollock, A. K. Miyamoto, V. J. Oyama, *Life Sciences and Space Research v. 8*, North-Holland, Amsterdam, 1970, p. 99.
128. G. E. Pollock, A. H. Kawauchi, *Anal. Chem.*, **40**, 1356 (1968).
129. F. Rautin, B. N. Khare, *J. Chromatogr.*, **75**, 13 (1973).
130. G. E. Pollock, *Anal. Chem.*, **44**, 2368 (1972).
131. K. A. Kvenvolden, E. Peterson, G. E. Pollock, *Nature*, **221**, 141 (1969).
132. K. A. Kvenvolden, J. C. Lawless, C. Ponnomperuma, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 486 (1971).
133. K. A. Kvenvolden, E. Peterson, F. S. Brown, *Science*, **169**, 1079 (1970).
134. J. W. Westley, B. Halpern, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **40**, 2046 (1968).
135. G. S. Ayers, R. E. Monroe, J. H. Mossholder, *J. Chromatogr.*, **63**, 256 (1971).
136. P. Y. Howard, W. Parr, *Chromatographia*, **7**, 283 (1974).
137. S. Lande, R. A. Landowne, *Tetrahedron*, **22**, 3085 (1966).
138. S. Nakaparskin, E. Gil-Av, J. Oro, *Anal. Biochem.*, **33**, 374 (1970).
139. H. Okamo, T. Okuyama, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, **90**, A 46, 834 (1969).
140. W. Parr, P. Howard, *J. Chromatogr.*, **66**, 141 (1972).
141. G. E. Pollock, V. J. Oyama, R. D. Johnson, *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 174 (1965).
142. B. Halvern, J. Richs, J. W. Wesbley, *Austral. J. Chem.*, **20**, 389 (1967).
143. B. Halpern, J. W. Westley, B. Weinstein, *Nature*, **210**, 259 (1966).
144. R. A. Landowne, *Chim. Anal.*, **47**, 589 (1965).
145. B. Halpern, J. W. Westley, J. Wredenhagen, J. Lederberg, *Biochim., Biophys. Res. Commun.*, **20**, 710 (1965).
146. B. Halpern, J. W. Westley, *Там же*, **19**, 361 (1965).
147. W. A. Bonner, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 159 (1972); **11**, 101 (1973).
148. J. C. Dabrowski, D. W. Cooke, *Anal. Chem.*, **43**, 791 (1971).
149. E. Bayer, E. Gil-Av, W. A. König, S. Nakaparski, J. Oro, W. Parr, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1978 (1970).
150. H. Iwase, A. Murai, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 8 (1974).
151. H. Iwase, *J. Chromatogr.*, **93**, 233 (1974).
152. E. Solem, E. Jellum, L. Eldjarn, *Clin. Chim. Acta*, **50**, 393 (1974).
153. T. Nambara, J. Goto, K. Taguolu, T. Iwata, *J. Chromatogr.*, **100**, 184 (1974).
154. M. Halpern, J. W. Westley, *Chem. Commun.*, **1965**, 246.
155. B. Halpern, J. W. Westley, *Tetrahedron Letters*, **21**, 2282 (1966).
156. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler, in *Gas Chromatography*, ed. A. B. Littlewood, Inst. Petrol., London, 1967, p. 227.
157. E. Gil-Av, B. Feibush, *Tetrahedron Letters*, **35**, 3345 (1967).
158. S. Nakaparskin, P. Birrel, E. Gil-Av, J. Oro, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 177 (1970).
159. W. A. Koenig, W. Parr, H. O. Lichtenstein, E. Bayer, J. Oro, *Там же*, **8**, 183 (1970).
160. K. Biemann, W. Vetter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 578 (1960).
161. W. Parr, J. Pleterski, C. Young, E. Bayer, in *Advances in Chromatography*, ed. A. Zlatkis, Univ. Houston, Houston, Texas, 1970, p. 277.
162. W. Parr, J. Pleterski, C. Young, E. Bayer, *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 141 (1971).
163. W. Parr, J. Pleterski, C. Young, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **50**, 510 (1970).
164. W. Parr, J. Pleterski, C. Young, E. Bayer, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 591 (1970).
165. W. Parr, C. Young, E. Bayer, E. Gil-Av, in *Advances in Chromatography* ed A. Zlatkis, Univ. Houston, Houston, Texas, 1970, p. 287.
166. W. Parr, C. Young, E. Bayer, E. Gil-Av, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 591 (1970).
167. W. Parr, P. Howard, *Chromatographia*, **4**, 162 (1971).
168. J. A. Corbin, J. E. Rhoad, L. B. Rogers, *Anal. Chem.*, **43**, 327 (1971).
169. B. Feibush, E. Gil-Av, T. Tamari, *Israel J. Chem.*, **8**, 50 (1970).
170. R. L. Stein, B. L. Karger, W. J. Keane, H. C. Rose, *J. Chromatogr.*, **39**, 17 (1969).
171. W. A. Koenig, G. J. Nicholson, *Anal. Chem.*, **47**, 951 (1975).

172. B. C. Pettitt, J. E. Stouffer, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 735 (1970).
173. H. R. Morris, *FEBS Letters*, **22**, 257 (1972).
174. H. R. Morris, R. J. Dickinson, D. H. Williams, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 247 (1973).
175. M. Jacobson, J. F. O'Brian, *Ch. Hedicoth*, *Anal. Biochem.*, **25**, 363 (1968).
176. F. Weygand, A. Prox, W. König, H. H. Fessel, *Angew. Chem.*, **75**, 724 (1963).
177. E. Fahr, R. Pastille, M. Magerl, *Z. Naturforsch.*, **28b**, 454 (1973).
178. Yu. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, *FEBS Letters*, **21**, 300 (1972).
179. H. Lindley, P. C. Davis, *J. Chromatogr.*, **100**, 117 (1974).
180. Э. Купперт, Э. Коллик, М. Люйт, Изв. АН СССР, сер. хим. геол., **19**, 183 (1970).
181. J. Ulehla, *Sb. ceskosl. acad. zemed. ved, zyvoc. výroba*, **5**, 567 (1960).
182. L. N. Winter, P. W. Albro, *J. Gas Chromatogr.*, **2**, 1 (1964).
183. J. Janak, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **25**, 1780 (1960).
184. J. Vollmin, P. Kreimler, J. Omura, J. Seible, W. Simon, *Microchem. J.*, **11**, 73 (1966).
185. M. A. Ratcliff, E. E. Madley, P. G. Simmonds, *J. Org. Chem.*, **39**, 1481 (1974).
186. P. G. Simmonds, E. E. Madley, M. A. Ratcliff, G. P. Shulman, *Anal. Chem.*, **44**, 2060 (1972).
187. P. G. Simmonds, G. P. Shulman, C. H. Stemberger, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 36 (1969).
188. C. Merritt, D. H. Robertson, *J. Gas Chromatogr.*, **5**, 96 (1967).
189. L. N. Winter, P. W. Albro, Там же, **2**, 1 (1964).
190. J. M. Patterson, M. L. Baedecker, R. Musik, W. T. Smith, *Tobacco Sci.*, **13**, 26 (1969).
191. J. M. Patterson, W. Chen, W. T. Smith, Там же, **15**, 98 (1971).
192. J. M. Patterson, N. F. Naidar, E. P. Papadopoulos, W. T. Smith, *J. Org. Chem.*, **38**, 663 (1973).
193. W. T. Smith, T. B. Harris, J. M. Patterson, *J. Agr. Food. Chem.*, **22**, 480 (1974).
194. E. B. Higman, J. Sehmelitz, W. S. Schlotzhaner, Там же, **18**, 636 (1970).
195. M. C. Stack, *Biochem. J.*, **96**, 56P (1965).
196. M. V. Stack, *J. Gas Chromatogr.*, **5**, 22, (1967).
197. W. R. Johnson, J. C. Kang, *J. Org. Chem.*, **36**, 189 (1971).
198. B. Manger, *Chem. Commun.*, **1971**, 39.
199. A. B. Manger, *J. Chromatogr.*, **37**, 315 (1968).
200. R. A. W. Johnstone, T. J. Povall, J. D. Baty, *Chem. Commun.*, **1973**, 392.
201. C. Merritt, C. Dipietro, D. H. Robertson, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 668 (1974).
202. J. J. Pisano, T. J. Bronzert, *Anal. Biochem.*, **45**, 43 (1972).
203. J. J. Pisano, W. J. A. Vanden Havel, E. C. Horning, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 82 (1962).
204. P. E. Harmon, J. L. Paterson, W. J. A. Vanden Heuven, **25**, 452 (1968).
205. M. A. Hermondson, L. H. Ericson, K. Titoni, H. Neurath, K. A. Welsh, *Biochemistry*, **11**, 449 (1972).
206. J. J. Pisano, in *Methods Enzymology*, v. **25**, N. Y.—London, 1972, p. 27.
207. M. Rangersan, R. A. Ardrey, A. Darbre, *J. Chromatogr.*, **87**, 499 (1973).
208. J. Eyem, J. Sjöquist, *Anal. Biochem.*, **52**, 255 (1973).
209. A. S. Inglis, P. W. Nicholls, *J. Chromatogr.*, **86**, 117 (1973).
210. R. M. Legnin, H. D. Niall, *Biochim. Acta*, **257**, 76 (1972).
211. J. E. Attrill, W. C. Butts, W. T. Reiner, J. W. Hollerman, *Anal. Letters*, **3**, 59 (1970).
212. C. W. Gehrke, Ch. D. Ruyle, *J. Chromatogr.*, **38**, 473 (1968).
213. D. E. Vance, D. S. Feingold, *Anal. Biochem.*, **36**, 30 (1970).
214. W. M. Lamkin, N. S. Jones, T. Pan, D. N. Ward, *Anal. Biochem.*, **58**, 549 (1974).
215. W. M. Lamkin, J. W. Weatherford, N. S. Jones, T. Pan, D. N. Ward, Там же, **58**, 422 (1974).
216. N. Thekawa, O. Hoshino, R. Watanuki, *Anal. Biochem.*, **17**, 16 (1966).
217. J. R. Coulter, C. S. Han, *J. Chromatogr.*, **36**, 42 (1968).
218. C. W. Moss, M. A. Lambert, F. J. Diaz, Там же, **60**, 134 (1971).
219. J. R. Coulter, C. S. Han, in *New Techniques in Amino Acids, Peptide, Protein Anal.*, Ann. Arbor Sci. Publ., Ann. Arbor, 1971, ch. 2, p. 75.
220. F. P. Zscheite, B. L. Brannaman, *Anal. Biochem.*, **49**, 442 (1972).
221. E. D. Pellizzari, J. H. Brown, P. Talbot, L. F. Fabre, *J. Chromatogr.*, **55**, 281 (1971).
222. H. Narert, Там же, **106**, 218 (1975).
223. T. Ishibashi, M. Matsui, T. Kawabata, *Bunseki Kagaku*, **24**, 102 (1975).
224. J. J. Rash, Ch. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, K. C. Kuo, K. A. Kvenvolden, D. L. Stalling, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 444 (1972).
225. J. MacGee, *Feder. Proc.*, **23**, 531 (1964). *Anal. Biochem.*, **14**, 305 (1966).
226. R. L. Hancock, *J. Gas. Chromatogr.*, **2**, 363 (1966).
227. R. L. Hancock, D. L. Coleman, *Anal. Biochem.*, **10**, 365 (1966).
228. H. Miles, H. Fales, *Anal. Chem.*, **34**, 860 (1962).
229. R. L. Hancock, *J. Gas Chromatogr.*, **6**, 431 (1968).
230. R. L. Hancock, Там же, **7**, 366 (1969).
231. M. A. Quilliam, K. K. Ogilvie, T. B. Westmore, *J. Chromatogr.*, **105**, 297 (1975).
232. S. E. Hattox, J. A. McCloskey, *Anal. Chem.*, **46**, 1378 (1974).

233. F. D. Ganchel, K. Beyermann, R. K. Zahn, FEBS Letters, 6, 141 (1970).
234. C. W. Gehrke, D. B. Lakings, J. Chromatogr. Sci., 61, 45 (1971).
235. V. Pacakova, V. Miller, J. J. Cernohorsky, Anal. Biochem., 42, 549 (1971).
236. D. B. Lakings, Ch. W. Gehrke, Clin. Chem., 18, 810 (1972).
237. W. C. Butts, J. Chromatogr. Sci., 8, 474 (1970).
238. T. Hashizuma, Y. Sasaki, Anal. Biochem., 15, 199 (1966).
239. T. Hashizuma, Y. Sasaki, Там же, 21, 316 (1967); 24, 232 (1968).
240. Y. Sasaki, T. Hashizuma, Там же, 16, 1 (1966).
241. W. C. Butts, Anal. Letters, 3, 29 (1970).
242. W. C. Butts, W. T. Rainey, Anal. Chem., 43, 538 (1971).
243. V. Pacakova, J. Nekvasil, J. Chromatogr., 91, 459 (1974).

Институт физической химии АН УССР, Киев