

УДК 543.544

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ

С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, Г. В. Азвакумов, В. М. Белико

Рассмотрены вопросы общего и энантиомерного газохроматографического анализа аминокислотных смесей. Приведены данные по точности, воспроизводимости и линейному диапазону определения аминокислот. Исследована применимость различных типов производных с точки зрения их пригодности в количественном анализе. Поскольку анализ аминокислот включает, кроме газохроматографической процедуры и финального интегрирования, выделение из природного объекта и получение летучих производных, в обзоре уделено особое внимание ошибкам на каждой стадии анализа и их вкладу в результирующую воспроизводимость анализа.

Обзор представляет интерес для лиц, работающих в области химии природных соединений, биохимии, медицины, а также для специалистов, разрабатывающих методы анализа, связанные с получением летучих производных.

Библиография — 111 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение.	548
II. Летучие производные аминокислот и их хроматографическое разделение.	550
III. Количественный анализ.	565
IV. Примеры применения газохроматографического анализа аминокислот.	570

I. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в биохимии и химии белков и аминокислот (АК) были достигнуты большие успехи благодаря применению современных методов анализа, основанных на колоночной и тонкослойной хроматографии. Тем не менее, продолжается поиск более чувствительных и точных методов количественного анализа. Основным направлением этого поиска является газо-жидкостная хроматография (ГЖХ). Хотя до сих пор не найдены общепотребительные условия газохроматографического анализа, уже сейчас ясно, что ГЖХ аминокислот существенно точнее всех других методов, имеет исключительно низкий порог чувствительности при широком линейном диапазоне и поддается полной автоматизации.

В отличие от аминокислотного анализатора газовый хроматограф — универсальный прибор и может служить для анализа не только аминокислот, но и множества других биохимически важных веществ различной природы. Газовый хроматограф отлично сочетается с масс-спектрометром, что открывает уникальные возможности для идентификации минорных компонентов и аномальных АК. Наконец, ГЖХ является наиболее точным методом анализа смесей оптических изомеров (энантиомеров аминокислот).

Следует, однако, сразу же оговориться, что все преимущества ГЖХ в анализе АК можно реализовать только при использовании приборов достаточно высокого класса. Так, в ранних попытках применялись мало-чувствительные детекторы, металлические колонки с высоким процен-

том жидкой фазы, грубые носители при изотермическом режиме разделения, что вообще было характерно для состояния ГЖХ в конце 50-х — начале 60-х годов. В результате этих работ выяснилось, что производные АК являются термически нестойкими соединениями с широким диапазоном упругости паров, поэтому их анализ возможен только на колонках с весьма низким содержанием фазы, высокоинертными носителями и фазами при температурном программировании. Это потребовало применения высокочувствительного детектирования при низком уровне шумов и компенсации фоновых изменений, чему лучше всего удовлетворяет пламенно-ионизационное детектирование в компенсационных (двухколоночных) схемах. Широкое распространение получили стабилизированные фазы типа очень чистых полисилоксанов и полиэфиров, а также специальные носители, обеспечивающие минимальную адсорбцию при высокой однородности поверхности размеров и формы частиц, и лишенные каталитической активности. Это диатомитовые носители типа хромосорба W, супелькопорта, анакрома, газхрома и т. п. Выяснились преимущества не только стеклянных колонок, но и цельностеклянного разделительного тракта.

В целом стало ясно, что газовая хроматография аминокислот относится к числу самых трудных («деликатных») хроматографических задач и сравнима по своей сложности и требовательности к оборудованию и материалам разве что с ГЖХ стероидов. Сложность и важность таких задач привели к тому, что для их решения в последние годы стали выпускаться специальные хроматографы (так называемые хроматографы биомедицинского класса), которые в известном смысле по рациональности и качеству разделительного тракта являются вершиной хроматографической техники.

Это не означает, конечно, что хороших результатов нельзя добиться на обычном промышленном или самодельном приборе подходящей конструкции. Важно, чтобы такой прибор был снабжен цельностеклянным разделительным трактом, чувствительным линейным детектированием и был выполнен по двухколоночной схеме (для работы в режиме температурного программирования). Необходим блок воспроизводимого температурного программирования, желательно с автоматическим возвратом в начальный изотермический режим. Для количественного анализа скорости всех газов должны быть стабилизированы точными регуляторами расходов. Обязательно электронное интегрирование с отслеживанием дрейфа базовой линии. В последних работах, выполненных с применением современной техники исследования, получены, естественно, наиболее достоверные результаты.

По ГЖХ аминокислот имеется несколько обзоров¹⁻⁵, причем ранние работы достаточно полно освещены в обзоре Блау³. Авторы настоящего обзора постарались возможно более полно рассмотреть последние, наиболее существенные данные по развитию метода ГЖХ аминокислот, касающиеся как получения и разделения производных, так и вопросов количественного анализа. К сожалению, не все опубликованные исследования выполнены на достаточном количественном уровне. Это замечание относится и к опубликованным обзорам, поскольку в основном в них рассматриваются скорее вопросы получения производных и их хроматографирования, нежели характеристики, относящиеся к точности, воспроизводимости, порогу чувствительности и линейному диапазону, т. е. все то, что составляет предмет количественного анализа.

Настоящий обзор охватывает стандартные белковые аминокислоты. Аномальные аминокислоты, а также их I- и Se-содержащие аналоги рассмотрены в обзоре Коултера и Ханна⁶.

II. ЛЕТУЧИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

а. Стандартные белковые аминокислоты

Поскольку аминокислоты — практически нелетучие термически нестойкие соединения, прямой газохроматографический анализ их невозможен. Вполне естественно поэтому, что основную массу опубликованных работ по анализу аминокислот методом ГЖХ составляют исследования их превращений в удобные для разделения летучие вещества. Большинство этих работ выполнено на качественном или полуквантитативном уровне, охватывает более 80 типов продуктов превращений АК (см., например, Блау³). Многие из полученных результатов представляют лишь исторический интерес. Однако в целом они полезны как источник идей при решении частных задач и разработке новых методов идентификации и количественного анализа АК.

Известно несколько публикаций по пиролитической ГЖХ аминокислот, в которых показана принципиальная возможность анализа по углеводородному или аминному «профилю» продуктов термического распада. Однако осложнения, связанные с общностью продуктов пиролиза разных АК, с протеканием побочных реакций между АК и продуктами распада, требуют проведения специальных трудоемких исследований пиролиза смесей АК с использованием сложной техники математической обработки результатов и делают данное направление в целом малоперспективным в качестве стандартного метода количественного анализа смесей³.

Развитие анализа АК с помощью ГЖХ пошло иным путем — путем химических превращений АК в летучие соединения по принципу «одна АК — одно производное», причем попытки использовать окислительные, восстановительные и другие превращения АК в соединения других классов (в амины, альдегиды, аминокислоты и т. п.) не дали удовлетворительных результатов, в первую очередь, вследствие недостаточной универсальности и количественности методов. Наиболее перспективными оказались методы, основанные на защите карбоксильной и аминной, а также других функциональных групп.

Но и на этом пути возникают серьезные затруднения, обусловленные тем, что природные АК — вещества весьма разной химической природы, общей чертой которых является лишь аминогруппа в α -положении к карбоксилу. Поэтому, как отметил Блау³, трудно найти модифицирующие реагенты и условия количественного проведения реакций получения летучих производных, общие для всех природных АК. Не менее трудно найти условия для разделения таких негомологических смесей.

Опыт показывает, что лишь весьма немногие из предложенных производных действительно пригодны для простого и надежного количественного анализа, т. е. удовлетворяют перечисленным ниже необходимым требованиям:

- 1) простота, количественный выход производных, воспроизводимость и, желательно, быстрота превращения всех природных АК в смеси;
- 2) оптимальная летучесть производного, удобная для хроматографирования, но исключающая потери;
- 3) стабильность производного при работе и хранении в обычных лабораторных условиях;
- 4) стабильность в условиях газохроматографического опыта, т. е. в контакте с жидкой фазой и твердым носителем при температурах до 200—250°С;

5) возможность получения индивидуальных пиков на хроматограмме по принципу «одна АК — одно производное — один пик».

Пункты 4) и 5) ответственны за точность и воспроизводимость собственно хроматографического анализа, тогда как взятые совместно, они определяют точность и воспроизводимость всего метода в целом.

В настоящее время известно лишь два типа производных, достаточно полно удовлетворяющих перечисленным требованиям. Это некоторые из алкиловых эфиров N-ацилированных (обычно N-перфторацилированных) АК и в меньшей степени триметилсилильные производные (ТМС). В дальнейшем мы рассмотрим, главным образом, исследования с применением таких производных, а также производных других типов, которые были опубликованы после выхода в свет обзоров Блау³, Колтера и Ханна⁶.

По существу, газовая хроматография АК стала развиваться на основе работы Фишера⁷ по разделению метиловых эфиров АК методом ректификации. В 1957 г. Байер с сотр.⁸ разделил смесь таких эфиров. Он же указал⁹ на пригодность для ГЖХ N-трифторацетильных (ТФА) производных метиловых эфиров АК. С тех пор производные такого типа стали весьма интенсивно изучаться. В различных комбинациях были использованы формильная, ацетильная, трифторацетильная, пентафторпропионильная, гептафторбутирильная и другие защиты аминогруппы (а также OH- и SH-групп) в метиловых, этиловых, пропиловых, бутиловых, изоамиловых и других эфирах АК. К настоящему времени только бутиловые эфиры N-трифторацетильных производных могут быть разделены на наполненных колонках с соблюдением требования 5), что и определяет их исключительную важность для количественного анализа. В результате, главным образом, благодаря работам школы Герке, а также Дарбра, Блау и Ислама¹⁰ наиболее употребительными стали *n*-бутиловые эфиры N(O, S)-трифторацетилированных АК (ТАБ АК)* и, в меньшей степени, — соответствующие метиловые эфиры¹². Для этих производных были наиболее подробно изучены условия получения, дающие максимальный выход, возможные осложнения, вызванные присутствием примесей и окисляющим действием кислорода воздуха, устойчивость при хранении и газохроматографическом анализе, а также оптимальные условия разделения. Именно эти производные чаще всего используются при ГЖХ аминокислот.

Получение алкиловых эфиров N(O, S)-ацильных производных АК осуществляется обычно в две стадии¹³. На первой стадии АК превращается в алкиловый эфир под действием соответствующего спирта в присутствии HCl. Применяется также переэтерификация метиловых эфиров АК высшими спиртами¹⁴. После удаления избытка реагента в вакууме проводится ацилирование раствором соответствующего ангидрида в хлористом метиле, хлороформе или другом подходящем растворителе.

Следует отметить, что в последнее время выявлены новые агенты для защиты функциональных групп. В частности, для трифторацетилирования Донике¹⁵ недавно предложил использовать бис-трифторацетамид и его N-метилованный аналог. Применение этих реагентов автор рассмотрел на примере различных соединений, в том числе и некоторых АК. Среди их достоинств отмечаются мягкость условий ацилирования, возможность получения смешанных производных (триметилсилильная защита гидроксильных групп не затрагивается при ацилировании) и отсутствие побочных реакций, наблюдаемых при использовании трифторуксусного ангидрида^{16, 17}. Оба реагента достаточно летучи и выходят из колонок вскоре за растворителем.

* ТАБ АК были предложены и впервые разделены Зомзели и др.¹¹.

При анализе природных смесей перед получением производных необходимо очистить АК от белков, нуклеотидов, сахаров, липидов и других возможных примесей. Должны быть удалены ионы металлов, так как большинство из них препятствует получению количественных выходов производных¹⁸. Кроме того, попадая в испаритель и на колонку, эти ионы катализируют разложение вводимых проб. В работе¹⁹ подробно рассмотрен процесс очистки и осложнения, возникающие при анализе АК методом ГЖХ.

Наибольшей селективностью при разделении N-ацильных производных алкиловых эфиров АК обладают полиэфиры этиленгликоля и неопентилгликоля с янтарной, адипиновой и себаценовой кислотами^{13, 20, 21}. Наиболее термостойкая из этих фаз — неопентилгликольсебаценоат — пригодна для разделения ТАБ двадцати белковых АК²¹. Для этой же цели использовались колонки со смешанной фазой EGSS-X — диэтиленгликольсукцинат²². Полисилоксановые фазы (OV-1, OV-3, OV-7, OV-17, OV-25, OV-101, OV-210, OV-225, SE-30, SE-52 и т. д.), а также их смеси использовались, главным образом, для анализа смесей, содержащих тяжелые АК, разделение производных которых на полярных полиэфирах затруднено.

Большинство современных работ по разделению ТАБ восходит к работе Стефановича²³, который показал, что селективность колонок с полиэтиленгликольадипинатом (ПЭГА) зависит от количества нанесенной на твердый носитель фазы. В частности, для разделения ТАБ белковых аминокислот (кроме триптофана, аргинина, гистидина и цистина) наиболее подходящими оказались колонки, содержащие ПЭГА в количестве 0,65% от массы твердого носителя (хромосорба W). Оптимальная концентрация ПЭГА для разделения ТАБ зависит от применяемого твердого носителя — для хромосорба G она составляет 0,325%¹³.

ТАБЛИЦА 1

Энергия ΔG , ккал/моль (126° С), и теплоты растворения ΔH , ккал/моль (105—170° С) ТАБ некоторых АК на колонках с различным содержанием ПЭГА на хромосорбе W(A. W.)²¹

АК	— ΔH	— ΔG	— ΔH	— ΔG
	0,8% ПЭГА		3% ПЭГА	
Глицин	15,0	5,5	14,9	5,4
Лейцин	17,9	6,2	14,2	5,2
Метионин	20,2	7,4	18,0	6,9
Оксипролин	19,0	7,6	18,0	6,5
Фенилаланин	20,0	8,6	18,7	7,1

Многие современные исследования по разделению алкиловых эфиров N-ацильных производных АК на колонках с полярными полиэфирными фазами при низком содержании фазы выполняются с применением прокаленного при определенной температуре носителя. Витт и др.²⁴ показали, что даже такой малоактивный носитель, как хромосорб W, обладает остаточной способностью к адсорбции, существенной для селективности разделения. Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что свободная энергия, и энтальпия растворения на колонках с низким содержанием фазы выше, и что порядок выхода ТАБ (см. величины свободных энергий растворения) в условиях изотермического разделения зависит от количества фазы.

Эти данные, несомненно, указывают на то, что носители с низким процентом фазы являются, по существу, модифицированными сорбента-

ми, регулируемая селективность которых достигается изменением содержания фазы или термической обработкой носителя. Разделение на таких носителях чувствительно к виду температурной программы и длине хроматографической колонки. В частности, для колонки с активированным хромосорбом W длиной 3 м оптимальной концентрацией, обеспечивающей наилучшее разделение ТАБ, оказалось 0,58%²⁴ (для колонок длиной 1—1,5 м Стефанович²³ и Герке с сотр.¹³ установили оптимум в концентрации ПЭГА — 0,65%). Наибольшая селективность при длине колонки 1,5—1,8 м достигается при скорости роста температуры 2—4 град/мин¹³, а при длине 3 м — 2—2,5 град/мин.

По нашим данным, изменение марки носителя неподвижной фазы изменяет характер разделения. Можно ожидать, что дальнейшее использование модифицированных носителей такого рода расширит возможности анализа различных летучих производных АК.

Герке с сотр.²⁵ для разделения ТАБ АК предложили схему, основанную на использовании одного четырехколоночного прибора или двух двухколоночных приборов. Первая пара колонок с 0,65% стабилизированного ПЭГА на хромосорбе W(A. W.), прокаленном в течение 12 часов при 140°С, используется для разделения ТАБ семнадцати АК. Для разделения ТАБ аргинина, гистидина и цистина используется вторая пара колонок с 2% OV-17 (OV-101) и 1% OV-210 на силанизированном хромосорбе G. Обе пары колонок работают в условиях одной температурной программы и поэтому могут быть установлены на один четырехколоночный прибор, что позволяет проводить полный анализ белковых АК за один цикл. Температурная программа такова: 70°С в течение 10 мин, затем нагрев со скоростью 2—4 град/мин до 235°. АК вводятся в нагреваемую зону испарителя (до 240°). По данным Витта и др.²⁴, при анализе ТАБ АК выгоднее работать с холодным испарителем, подобрав соответствующим образом начальную изотермическую выдержку.

Постоянно ведутся работы с целью подбора условий анализа ТАБ всех двадцати белковых АК на одной паре колонок. Однако до сих пор эти исследования не дали хорошего результата. Недавно Герке и сотр.²⁶ сообщили об анализе ТАБ всех двадцати АК на одной колонке с 10% апиэзона M на хромосорбе W(HR). Но, судя по приводимым хроматограммам, разделение ТАБ недостаточно для точного количественного анализа: тринадцать пиков ТАБ белковых АК разделены неполностью.

Вероятно, более перспективными в этом отношении окажутся появившиеся позже алкиловые эфиры пентафторпропионильных и гептафторбутирильных производных АК. Полак и др.²⁷ впервые предложили бутиловые эфиры N(O, S)-пентафторпропионильных АК и изучили их разделение на силиконовых фазах. Мосс и др.²⁸ установили возможность применения *n*-пропиловых эфиров гептафторбутирильных производных АК. Они проводили анализ на колонке длиной 3,6 м с 3% OV-1 на хромосорбе W(A. W.), обработанном диметилхлорсиланом (DMCS), при программировании температуры от 100 до 250°С. Для получения единичного пика гистидина авторы вместе с пробой вводили уксусный ангидрид. По нашему мнению, для превращения на колонке моноацилгистидина в диацилпроизводное следовало бы вместе с пробой вводить тот же ангидрид, который используется для модификации, как это было впервые предложено Герке и др.²⁹ в случае ТАБ и как это делалось Енссоном и др.³⁰ при анализе АК в виде тех же N-гептафторбутирил-*n*-пропиловых эфиров.

Авторы работы³⁰ осуществили анализ на короткой стеклянной капиллярной колонке (6 м × 0,25 мм), к стенкам которой была химически привита диметилсилоксановая полимерная фаза. Они получили хорошее

разделение для производных всех белковых АК, кроме триптофана; для анализа цистеина перед модификацией проводилось превращение его в S-метилпроизводное.

Занетта и др.¹⁴ продемонстрировали хорошее одноколоночное разделение изоамиловых эфиров гептафторбутирильных производных с помощью 3% SE-30 на Gas-Chrom Q. По сравнению с ТАБ эти производные имеют более низкую летучесть, что снижает потери при упаривании; меньшую полярность, способствующую быстрой скорости анализа; при этом получаются симметричные пики.

Исследования с использованием алкиловых эфиров перфторацильных производных (особенно гептафторбутирильных) открывают к тому же возможность резкого снижения порога чувствительности (вплоть до 10^{-12} — 10^{-13} г), если для детектирования будет применен детектор электронного захвата.

Несмотря на явные достижения в области разделения и, как будет видно дальше, количественного анализа на основе эфиров перфторацильных производных АК, представляется заманчивым разработать одностадийный метод синтеза летучих производных.

В этом отношении представляют интерес работы Рогожина и др.³¹, которые показали, что N-ацилалкиловые эфиры аминокислот могут быть получены в одну стадию при конденсации эфиров o-карбоновых кислот с аминокислотами.

В одну стадию получают и N,O-триметилсилильные (ТМС) производные. По получению и разделению ТМС-производных* АК было выполнено довольно большое количество исследований³²⁻³⁶. В частности, были предложены новые силилирующие агенты — бис-триметилсилилацетамид³⁰, бис-триметилсилитрифторацетамид³⁴ и др.

Эти реагенты дают на хроматограмме пик, не интерферирующий с пиками ТМС-производных АК. Кроме того, применение бис-триметилсилитрифторацетамида уменьшает отложение окиси кремния в детекторе. Применение ТМС-производных аминокислот в количественном ГХ-анализе затрудняется тем, что некоторые аминокислоты образуют смесь продуктов силилирования, соотношения которых зависят от природы применяемого растворителя³⁴.

Харди и Керрин³⁷ для того, чтобы осуществить анализ двадцати белковых АК на одной колонке, применили смешанные производные — N(O, S)-триметилсилитрил-*n*-бутиловые эфиры. При этом весь анализ на стеклянной колонке длиной ~2,5 м и внутренним диаметром 2 мм, наполненной силанизированными пористыми стеклянными шариками с 0,2% OV-7, осуществлялся менее чем за 35 минут.

Авторы отмечают, что в отличие от свободных АК, в случае *n*-бутиловых эфиров на стадии силилирования в качестве растворителя можно использовать CH_2Cl_2 . При этом, с одной стороны, происходит силилирование гуанидильной группы аргинина и ω -аминогруппы лизина, что дает возможность анализировать эти АК, а, с другой стороны, удается избежать образования трис-триметилсилильного производного глицина, которое при хроматографировании выходит совместно с производными изолейцина. Однако, как и в случае чисто триметилсилильных производных АК, пики производных серина и треонина почти совсем не делятся, что, конечно, значительно осложняет количественный анализ этих двух АК. Кроме того, на хроматограмме наблюдаются маленькие пики, соответствующие триметилсилильным производным неэтерифицированных АК. Это указывает на неполное протекание реакции этерификации и, следовательно, на дополнительный источник ошибок при анализе.

* Разделение, как правило, осуществлялось на силиконовых фазах.

Тенот и Хорнинг³⁸ использовали для ГЖХ алкиловые эфиры N-диметиламинометиленовых производных АК, которые получают в одну стадию при реакции N,N-диметилформамида и диалкилацеталей с АК. Авторы получили производные глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, фенилаланина и лизина и разделили их на наполненных и капиллярных колонках с SE-30. Нам кажется, что до тех пор, пока не показана возможность быстрого и количественного получения подобных производных для «тяжелых» АК—триптофана, аргинина, гистидина, цистина — не имеет смысла говорить об их практической ценности (за исключением, разумеется, частных аналитических задач). Однако поскольку N,N-диметилформамиддиалкилацетали не реагируют в подходящих условиях с окси- и тио-группами, применение рассмотренных производных всегда будет носить ограниченный характер.

Недавно^{39, 40} в качестве одностадийной реакции получения производных для ГЖХ предложено изопропилирование АК. Однако и эти производные вряд ли найдут широкое применение, так как хорошие выходы получаются только для аминокислот без каких-либо функциональных групп (кроме карбоксильной и α -аминогруппы). Более того, некоторые аминокислоты дают несколько производных.

По-видимому, не найдет широкого применения и предложение Митчелла⁴¹ использовать для ГЖХ шиффовы основания аминокислот, получающиеся путем присоединения бензальдегида или 2,4-пентадиона к метиловым эфирам АК. Едва ли удастся распространить эту методику на все белковые АК и добиться достаточно воспроизводимых результатов.

Вильямс и Халперн⁴² предложили проводить газохроматографический анализ АК путем пиролиза в испарителе хроматографа триметиланилиниевых солей N-неопентилиденовых производных АК. Эти соли получают в одну стадию при реакции с 2,2-диметилпропаналем и гидроокисью триметиланилина в метаноле в течение 15 минут при 80°С в присутствии молекулярных сит 3 Å. При вводе в горячий испаритель хроматографа они распадаются с образованием N-неопентилидиенового производного метилового эфира соответствующей АК. При этом происходит также метилирование оксигрупп. Атомы азота в молекуле пролина и в индольной части молекулы триптофана также метилируются. Полученные производные успешно хроматографировались на колонке из нержавеющей стали длиной ~2,5 м, наполненной 5% OV-17 на хромосорбе W(DMCS). Однако и в этом случае нельзя хроматографировать все белковые АК: гистидин не дает летучего производного. Кроме того, аргинин и цистеин дают по несколько продуктов. Впрочем, на наш взгляд, эти затруднения, возможно, удастся обойти, если заменить колонку и, особенно, испаритель на стеклянные и тщательно подобрать температуру пиролиза.

Наконец, следует отметить, что в последнее время при попытках отыскать удобный одностадийный метод получения летучих производных АК различные исследователи вновь проявляют интерес к получению циклических производных АК. Так, Граль-Нильсен и Солхейм⁴³ исследовали хроматографическое поведение различных 2-алкилоксазолин-5-оновых производных лейцина^{44, 45} и показали, что, хотя эти вещества весьма реакционноспособны, тем не менее их термическая стабильность делает их вполне пригодными для хроматографического анализа. Авторы рекомендуют в качестве предпочтительного производного при разделении изомеров лейцина 2-трифторметилоксазолин-5-он, получающийся при реакции лейцинов с трифторуксусным ангидридом. Однако мы считаем, что едва ли удастся получить подобные производные для более

сложных АК и достичь количественных выходов. Кроме того, высокая летучесть производных, облегчающая хроматографирование, может приводить к существенным потерям на неизбежной стадии отгонки образующейся трифторуксусной кислоты.

Гусек⁴⁶ использовал реакцию АК с дихлортетрафторацетоном, также дающую в одну стадию аналогичные производные^{47, 48} для анализа тирозина и его моно- и диодпроизводных. Применение этой реакции, по-видимому, будет еще более ограниченным, так как в этом случае для защиты окси-, ω -амино- и т. п. функциональных групп требуются дополнительные реакции. (Окси-группу тирозина Гусек защищал реакцией с перфтормасляным ангидридом). Следует, однако, напомнить, что подобные производные с большим количеством атомов галогенов в молекуле позволяют резко снизить порог чувствительности при использовании детектора электронного захвата, и поэтому могут оказаться чрезвычайно полезными при решении частных задач.

Следует отметить интерес к ГЖХ тиогидантоиновых производных АК. В общем, эти производные не очень удобны для газохроматографического анализа, но важны в связи с установлением первичной структуры пептидов и белков по методу Эдмана и Бегга. Мы не рассматриваем вопросы анализа этих производных, так как недавно появился достаточно полный обзор Пизано и др.⁴⁹ Кроме того, применение ГЖХ для определения N-концевых АК белков и пептидов рассмотрено Росмусом и Дейлом⁵⁰. Из последних работ интересно отметить анализ фенилтиогидантоинов на коротких капиллярных колонках⁵¹.

б. Энантиомеры аминокислот

В настоящее время известно два способа разделения энантиомеров методом газовой хроматографии. Первый основан на количественном превращении энантиомеров в диастереомеры под действием диссимметрического агента. Диастереомеры затем разделяются на обычной хроматографической фазе⁵²⁻⁵⁴. Другой метод основан на применении диссимметрической стационарной фазы⁵⁵.

Вейнганд⁵³ впервые осуществил разделение диастереомерных производных АК методом ГЖХ на примере дипептидов; одновременно возможность определения энантиомерной чистоты и конфигурации методом ГЖХ была показана рядом исследователей на примере значительно более удобных N-трифторацетильных (N-ТФА) диастереомерных эфиров аминокислот⁵⁶⁻⁶³.

В частности, нами⁶³, а также Поллоком и др.⁵⁹, Жиль-Авом и др.⁵⁶ в 1965 г. было описано разделение эфиров N-ТФА аминокислот с оптически активными *втор*-бутиловым спиртом и ментолом⁶¹. После этого появилось большое число исследований, посвященных этому вопросу⁶³⁻⁷⁸.

Что касается определения конфигурации методом ГЖХ, то следует отметить установленную рядом авторов связь между порядком выхода диастереоизомерных производных и их конфигурацией. Так, было выяснено, что в ряду эфиров аминокислот^{59, 64, 65} наименьшей энергией растворения в фазе, а следовательно, и наименьшим удерживаемым объемом обладают *RR*- и *SS*-конфигурации диастереомерных эфиров, а *RS*- и *SR*-формам соответствуют большие значения удерживаемых объемов. Исключением является 2-бутиловый эфир природной АК — фенилглицина⁶⁴. Для ряда амидов, полученных из эфиров аминокислот

и аминов:
$$\text{RCH}(\text{NHCOCF}_3)\text{CONH}-\underset{\substack{| \\ \text{R}''}}{\text{CH}}-\text{R}' \quad (\text{R}' - \text{алкил}, \text{R}'' - \text{алкил})$$

или COOR) было установлено, что SS-диастереомер элюируется после SR — формы⁶⁶. По мнению авторов, это объясняется тем, что SS-структура амидов имеет более открытую форму, в результате чего амидный водород в этой структуре более доступен для взаимодействия с карбоксильной группой полиэфирной фазы (установлено, что такое взаимодействие существует⁶⁶).

Хотя разделение N-ТФА-втор-бутиловых эфиров АК может быть осуществлено как на наполненных^{68, 69, 71}, так и на капиллярных колонках^{69, 81, 84, 85}, однако практически только капиллярная хроматография дает удовлетворительные результаты (т. е. результаты, пригодные для количественного анализа), что связано с малым значением $\Delta(\Delta G)$ для большинства исследованных фаз⁶⁹ (см. табл. 2). Другой недостаток разделения АК в виде N-ТФА-втор-бутиловых эфиров — малая доступность энантиомерно чистого втор-бутанола. С другой стороны, разделение этого типа диастереомеров позволяет анализировать энантиомеры тяжелых аминокислот, что затруднительно в случае более объемных L-ментильных производных.

ТАБЛИЦА 2

Значения $-\Delta(\Delta G)$, кал/моль,
для N-ТФА-втор-бутиловых эфиров
аминокислот (125° С) на различных фазах

АК	ПЭГА	ПЭГ	НПГА
Аланин	44,0	57,0	42,0
Валин	52,0	44,0	44,0
Лейцин	45,0	57,0	50,0
Изолейцин	70,0	86,0	55,0
Норвалин	35,0	52,0	32,0
Норлейцин	47,0	44,0	32,0
α -Амино-октановая кислота	67,0	39,0	—

Обозначения: ПЭГА — полиэтиленгликольадипинат, ПЭГ — полиэтиленгликоль, НПГА — неоментилгликольадипинат.

ТАБЛИЦА 3

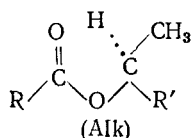
Значения $-\Delta(\Delta G)$, кал/моль,
L-ментильных эфиров N-ТФА аминокислот
(160° С) на различных фазах

АК	ПЭГА	ПЭГ	НПГА	Апие- зон-L
Аланин	109,0	117,0	59,0	99,0
Валин	188,8	127,0	88,0	109,0
Лейцин	145,0	—	124,0	108,0
Изолейцин	141,0	—	124,0	138,0
Норвалин	145,0	—	118,0	104,0
Норлейцин	109,0	—	112,0	118,0
α -Аминомасля- ная кислота	149,0	—	138,0	89,0

N-ТФА-L-ментильные производные АК обладают очень большими значениями $\Delta(\Delta G)$ (см. табл. 3)⁶⁹, позволяющими работать с обычными (наполненными) колонками⁶³. Трудностью в этом случае является лишь получение производных. По-видимому, на величину $\Delta(\Delta G)$ влияет конформационная неподвижность групп.

При хроматографировании N-ТФА-L-пролил-2-метилиндола было получено⁷² самое большое значение $\Delta(\Delta G^\circ)$, равное 298 кал/моль для всех известных случаев разделения диастереомеров. В этом соединении асимметрические центры расположены в кольце так, что группы, связанные с ними, в большей степени конформационно неподвижны.

Если диссимметрический агент ациклический, то три группы, связанные с асимметрическим центром, должны быть возможно большего размера. Дело в том, что в молекуле диастереомерного эфира свободное вращение вокруг связи O—(Alk) затруднено



из-за наличия соседней карбонильной группы. При изменении радикала R' от CH_3 до *трет*- C_4H_9 наблюдается улучшение разделения за счет уменьшения конформационной подвижности, обусловленного увеличением энергетического барьера свободного вращения вокруг $Alk-O$ -связи^{66, 72}.

Как уже указывалось, другой способ ГХ-анализа энантиомеров — разделение их на диссимметрической фазе. Первый достоверный результат был получен Жиль-Авом и др.⁷⁸ в 1967 г. при разделении этиловых, *n*-пропиловых, изопропиловых, *n*-бутиловых и 2-бутиловых эфиров N-ТФА аланина, валина и лейцина на лауриловом эфире N-ТФА-*L*-изолейцина. При этом производные с одним асимметрическим центром давали два пика, а с двумя — четыре. Разделение было частичным: метиловые эфиры не делились вообще, и лишь эфиры циклопентанола разделились полностью.

В настоящее время для газохроматографического анализа энантиомерных производных аминокислот применяются четыре типа диссимметрических стационарных фаз (см. табл. 4):

I. Эфиры N-ТФА аминокислот и спиртов C_6-C_{12} ^{78, 79}.

II. Уреид изопропилового эфира валина^{55, 80, 81} (для разделения аминов и аминокислот).

III. Эфиры N-ТФА дипептидов и спиртов C_4-C_6 ^{58, 80-90}.

IV. Амиды^{91, 92}.

Объектами разделения служат чаще всего изопропиловые эфиры N-ТФА аминокислот. На пептидных и эфирных *L*-фазах *D*-изомер элюируется раньше, чем *L*, что и позволяет определять конфигурации аминокислот. На уреидной фазе порядок выхода энантиомеров связан с размерами алкильных радикалов при асимметрическом центре и в эфирной группе молекулы энантиомера⁸⁰.

По мнению Жиль-Ава и др.^{82, 84, 85}, механизм разделения заключается в образовании диастереомерных комплексов энантиомеров аминокислот с диссимметрической фазой. Предполагается, что связь молекул в этих «комплексах» осуществляется через водородные мостики. В других работах высказаны предположения о строении образующихся «комплекс»^{79, 84, 85}, а также проведены исследования по выяснению роли амидной и эфирной частей дипептида^{85, 86, 91} в образовании «комплекса» с энантиомерными производными аминокислот. Независимо от того, будем ли мы связывать растворение производных аминокислот в пептидной фазе с образованием «комплекса», или объяснять наблюдаемую разницу в энергии растворения специфической сольватацией и статистическим распределением типов ассоциаций, ясно, что именно амидная часть дипептида ответственна за формирование стереоселективного эффекта^{86, 91}, хотя эфирным концом вносятся важные вторичные стерические вклады^{85, 86}. Именно поэтому трипептидные, а тем более полипептидные, фазы оказались менее пригодными для разделения энантиомерных производных АК, чем дипептидные^{84, 88}.

Наилучшие результаты по разделению энантиомеров аминокислот (имеются в виду наибольшие значения $\alpha_{L/D}$ *) получены при использовании дипептидных стационарных фаз типа (III), в которых углеводородные радикалы при асимметрических центрах дипептида и эфирные радикалы достаточно объемны и разветвлены (например, циклогексиловый или *трет*-бутиловый эфиры N-ТФА *L*-валил-*L*-валина), а также на стационарных фазах типа (IV).

Было показано, что структура летучего производного аминокислоты имеет существенное значение для разделения^{84, 85, 88, 91}. Так, при разделе-

* $\alpha_{L/D}$ — отношение удерживаемых объемов *L*- и *D*-энантиомеров аминокислот.

нии N-ТФА-изопропиловых эфиров аминокислот на N-ТФА-циклогексильном эфире *L*-норвалил-*L*-норвалина были отмечены⁸⁸ следующие закономерности.

а) Последовательное удлинение углеводородного радикала, переход от изопропилового эфира N-ТФА аланина к соответствующим производным α -аминомасляной кислоты и норвалина приводит к уменьшению $\alpha_{L/D}$.

б) Замена протонов в метильной группе аланина (те же производные) на метильные группы дает следующий ряд для $\alpha_{L/D}$ ⁸³:

аланин > α -аминомасляная кислота > валин >> *трет*-лейцин.

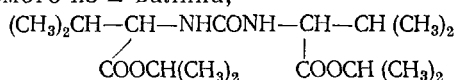
в) Для лейцинов значения $\alpha_{L/D}$ располагаются в ряд: лейцин-изолейцин > *n*-лейцин >> *трет*-лейцин.

Авторы⁸⁸ объясняют эти закономерности стерическими затруднениями при образовании комплекса с фазой.

Пролин, в N-ТФА производном которого отсутствует амидный водород, дает наиболее низкий фактор разделения из всех аминокислот на имеющихся фазах^{91, 93}. Энантиомеры аспарагиновой кислоты тоже сравнительно плохо разделяются⁹³ (этого нельзя сказать о глутаминовой кислоте).

Все летучие производные аминокислот, удовлетворительно делящиеся на энантиомеры, содержат группу $-\text{CONH}^*\text{CHR}-\text{CO}-$. Качество разделения тесно связано с наличием этой структуры⁸⁴. Об этом свидетельствует тот факт, что на изопропиловом эфире N-ТФА-*L*-валил-*L*-валина N-ТФА-2-аминогептан дает лишь легкий перегиб, а изопропиловые эфиры N-2,2,2-трифторэтилаланина $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}-\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ и N-ТФА- β -аминомасляной кислоты не расщепляются вообще⁸². По мнению авторов, эти производные не образуют «комплексов» с фазой, характеризующихся тремя водородными связями. В случае дипептидов с их высокой способностью образовывать водородные связи селективная ассоциация через два или три мостика, например, в случае N-ТФА-2-аминогептана, имеет очень небольшой статистический вес⁸⁴.

Если для разделения на пептидной фазе необходимо наличие группы $-\text{CO}-\text{NH}-\text{HCR}-\text{CO}-$ (акцепторные и донорные участки расположены с обеих сторон от асимметрического центра), то для производного мочевины, получаемого из *L*-валина,



который разделяет и амины, и аминокислоты, достаточно наличие группы $-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}^*$ ⁸⁰. При этом важно, что на порядок выхода *D*- и *L*-изомеров производных аминокислот $\text{RCH}(\text{NHCOCF}_3)\text{CO}_2\text{R}'$, влияет лишь размер R- и $\text{CO}_2\text{R}'$ -групп и в некоторой степени разветвленность углеводородных радикалов.

Трипептидные фазы использовались для разделения энантиомеров^{84, 86}. При этом их рабочие температуры на $\sim 10^\circ$ выше, чем рабочая температура дипептидной фазы, а фактор разделения незначительно ниже. Кроме того, эфиры трипептидов могут быть использованы для составления бинарных композиций фаз с т. пл. $< 80^\circ\text{C}$.

Изучались также полипептидные фазы; разделение на них было плохим, так что они вряд ли могут быть применены для практического разделения энантиомеров⁸⁶.

N-Пентафторпропионильные и N-гептафторбутирильные производные эфиров дипептидов могут применяться для разделения энантиомеров аминокислот⁸⁶, а соответствующие N-ацильные производные эфиров

Разделение производных энантиомерных аминокислот на диссимметрических фазах

Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания	Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания	
90° С, колонка из пирекса 50—100 м, $d=0,25$ мм; фаза — лауриловый эфир N-ТФА- <i>L</i> -лейцина ^{79, 82}			D- и <i>L</i> -аспарагиновой кислоты			
N-ТФА-2-бутиловые эфиры:		Разделение полное	D- и <i>L</i> -метионина	1,039		
D- и <i>L</i> -аланина	—		D- и <i>L</i> -фенилаланина	1,072		
D- и <i>L</i> -валина	—		D- и <i>L</i> -глутаминовой кислоты	1,082		
D- и <i>L</i> -лейцина	—			1,081		
N-ТФА-метилловые и этиловые эфиры:		Почти не делятся	110° С; стальной капилляр 150 м×0,5 мм; фаза-N-ТФА-циклогексильовый эфир <i>L</i> -валил- <i>L</i> -валина ⁸²			
D- и <i>L</i> -аланина			N-ТФА-изопропиловые эфиры:			
N-ТФА-изопропиловые эфиры:		Разделение плохое	D- и <i>L</i> -аланина	1,096	10 компонентов из 34 не определяются	
D- и <i>L</i> -аланина	1,001		D- и <i>L</i> -аминомасляной кислоты	1,089		
N-ТФА- <i>n</i> -бутиловые эфиры:		D- и <i>L</i> -валина	1,080			
D- и <i>L</i> -аланина	1,012	Перегиб	Глицина	—		
N-ТФА-циклопентилловые эфиры:		Разделение полное	D- и <i>L</i> -треонина	1,104		
D- и <i>L</i> -аланина	1,069		D- и <i>L</i> - <i>n</i> -валина	1,095		
100° С; колонка 2 м×1 мм, 5% фазы на хромосорбе W; фаза — циклогексильовый эфир N-ТФА- <i>L</i> -валил- <i>L</i> -валина ⁸⁰			D- и <i>L</i> -аллоизолейцина	1,097		
N-ТФА-трет-бутиловые эфиры D- и <i>L</i> -аланина	—	Разделение неполное	D- и <i>L</i> -изолейцина	1,077		
			β -аланина	—		
110° С; стальной капилляр 150 м×0,5 мм, давление He 1,5 атм, фаза — та же ⁸²			D- и <i>L</i> -лейцина	1,114		
N-ТФА-метилловые эфиры:		7 компонентов из 31 не определяются (пики накладываются)	D- и <i>L</i> -серина	1,080		
D- и <i>L</i> -аланина	1,067		D- и <i>L</i> -аллотреонина	1,080		
D- и <i>L</i> -аминомасляной кислоты	1,056		D- и <i>L</i> - <i>n</i> -лейцина	—		
D- и <i>L</i> -валина	1,031		D- и <i>L</i> -пролина	1,041		
Глицина	—		110° С; стальной капилляр 30 м×0,5 мм; фаза — та же ⁸²			
D- и <i>L</i> -треонина	1,053		N-ТФА-изопропиловые эфиры:			
D- и <i>L</i> - <i>n</i> -валина	1,054		D- и <i>L</i> -аспарагиновой кислоты	1,062		
D- и <i>L</i> -аллоизолейцина	1,054		D- и <i>L</i> -метионина	1,116		
D- и <i>L</i> -изолейцина	1,059		D- и <i>L</i> -фенилаланина	1,138		
D- и <i>L</i> -лейцина	1,057		D- и <i>L</i> -глутаминовой кислоты	1,123		
D- и <i>L</i> -серина	1,045		110° С; стальной капилляр 120 м×0,5 мм; фаза — та же ^{82, 93}			
D- и <i>L</i> -норлейцина	1,055		N-ТФА- <i>n</i> -бутиловые эфиры:		4 компонента из 23 не определяются	
D- и <i>L</i> -пролина	1,044		D- и <i>L</i> -аланина	1,087		
			D- и <i>L</i> -валина	1,056		
			Глицина	—		
		D- и <i>L</i> -треонина	1,095			

<i>D</i> - и <i>L</i> -аллоизолейцина	1,083		<i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -пропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,106	
<i>D</i> - и <i>L</i> -изолейцина	1,059		<i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,113	
<i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,099		<i>N</i> -ТФА-циклопентиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,139	
<i>D</i> - и <i>L</i> -серина	1,079				
<i>D</i> - и <i>L</i> -пролина	1,045				
110° С; стальной капилляр 60 м×0,5 мм; фаза — та же ⁸² <i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -бутиловые эфиры:			107—109° С; стеклянный капилляр 70 м×0,25 мм; фаза — изопропиловый эфир <i>N</i> -ТФА- <i>L</i> -валил- <i>L</i> -валина ⁸⁴		
<i>D</i> - и <i>L</i> -метионина	1,110		<i>N</i> -ТФА-метиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,076	
<i>D</i> - и <i>L</i> -фенилаланина	1,120		<i>N</i> -ТФА-этиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,103	
<i>D</i> - и <i>L</i> -аспарагиновой кислоты	1,060		<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры: <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,126	
110° С; стальной капилляр 120 м×0,5 мм; фаза — та же ⁸² <i>N</i> -ТФА-3-пентиловые эфиры:			<i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -пропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,103	
<i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,130	6 компонентов из 27 не определяются	<i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,214	
<i>D</i> - и <i>L</i> -α-аминомасляной кислоты	1,119		<i>N</i> -ТФА-циклопентиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,133	
<i>D</i> - и <i>L</i> -валина	1,090				
Глицина	—				
<i>D</i> - и <i>L</i> -треонина	1,100				
<i>D</i> - и <i>L</i> -аллоизолейцина	1,116				
<i>D</i> - и <i>L</i> -изолейцина	1,098				
<i>D</i> - и <i>L</i> -серина	1,123				
<i>D</i> - и <i>L</i> - <i>n</i> -лейцина	1,130				
<i>D</i> - и <i>L</i> -пролина	1,039				
110° С; стальной капилляр 60 м×0,5 мм; фаза — та же ⁹³ <i>N</i> -ТФА-3-пентиловые эфиры:			139° С; стеклянный капилляр 70 м×0,25 мм; фаза — изопропиловый эфир <i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -валил- <i>L</i> -валина ⁸⁴		
<i>D</i> - и <i>L</i> -серина	1,123		<i>N</i> -ТФА-метиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,072	
<i>D</i> - и <i>L</i> -аспарагиновой кислоты	1,083		<i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -пропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,086	
<i>D</i> - и <i>L</i> -фенилаланина	1,099		<i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,130	
100° С; стеклянный капилляр 60 м×0,25 мм; фаза — та же ⁹³ <i>N</i> -ТФА-метиловый эфир <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина			<i>N</i> -ТФА- <i>n</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,090	
<i>N</i> -ТФА-этиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,080		<i>N</i> -ТФА-циклопентиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,095	
<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,106		<i>N</i> -ацетилизопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,103	
<i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,136				
<i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,207				
			140° С; стальной капилляр 120 м×0,5 мм; фаза — циклогексиловый эфир <i>N</i> -ТФА-фенилаланил- <i>L</i> -лейцина ^{83, 90}		
			<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры: <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,073	
			<i>D</i> - и <i>L</i> -изолейцина	1,070	

ТАБЛИЦА 4 (продолжение)

Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания	Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания
<i>D</i> - и <i>L</i> -треонина	—		<i>N</i> -ГФБ- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,142	
<i>D</i> - и <i>L</i> -валина	1,045		<i>N</i> -пентадекафтороктаноилпроизводные (<i>N</i> -ПДФО):		
Глицина	—		<i>N</i> -ПДФО-метилловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,100	
<i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,083		<i>N</i> -ПДФО-изопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,137	
<i>D</i> - и <i>L</i> -серина	—		<i>N</i> -ПДФО- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,177	
<i>D</i> - и <i>L</i> -пролина	1,00				
140° С; стальной капилляр 30 м×0,5 мм; фаза — та же ⁸³			100°, 110°, 120°, 130° С (данные указаны в соответствующей последовательности); стальной капилляр 120 м×5 мм; фаза — циклогексиловый эфир <i>L</i> -норвалил- <i>L</i> -норвалина ⁸³		
<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры:			<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры:		
<i>D</i> - и <i>L</i> -аспарагиновой кислоты	—		<i>D</i> - и <i>L</i> -аланина	1,110	
<i>D</i> - и <i>L</i> -метионина	—			1,087	
<i>D</i> - и <i>L</i> -фенилаланина	—			1,075	
<i>D</i> - и <i>L</i> -глутаминовой кислоты	—			1,063	
				1,083	
130° С; стальной капилляр 10 м×0,5 мм; фаза — та же ⁸³			<i>D</i> - и <i>L</i> -валина	1,069	
<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры:				1,050	
<i>D</i> - и <i>L</i> -фенилаланина	—			1,044	
<i>D</i> - и <i>L</i> -глутаминовой кислоты	—		<i>D</i> - и <i>L</i> -изолейцина	1,108	
<i>D</i> - и <i>L</i> -тирозина	—			1,093	
				1,079	
110° С; стальной капилляр 120 м×0,5 мм; фаза — та же ⁹²				1,068	
Метилловые эфиры <i>N</i> -ТФА <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,082		<i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,100	
<i>N</i> -ТФА-изопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,127			1,096	
<i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,176			1,082	
<i>N</i> -пентафторпропионил (<i>N</i> -ПФП) метилловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,090			1,070	
<i>N</i> -ПФП-изопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,123		<i>D</i> - и <i>L</i> -α-аминомасляной кислоты	1,097	
<i>N</i> -ПФП- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,167			1,086	
<i>N</i> -гептафторбутирилпроизводные (<i>N</i> -ГФБ):				1,071	
<i>N</i> -ГФБ-метилловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,091		<i>D</i> - и <i>L</i> -норвалина	1,060	
<i>N</i> -ГФБ-изопропиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -лейцина	1,129			1,092	
				1,081	
				1,070	
				1,060	

12*

ТАБЛИЦА 4 (окончание)

Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания	Аминокислоты и их аналитические формы	$\alpha_{L/D}$	Примечания
<i>D</i> - и <i>L</i> - α -аминогексановой кислоты	0,968 0,985 0,989 0,994 0,997 1,002 1,027		<i>D</i> - и <i>L</i> - <i>трет</i> -лейцина	1,000 1,015 — — — 1,019	
<i>D</i> - и <i>L</i> - α -аминооктановой кислоты	0,956 0,973 0,977 0,979 — 0,990 1,016 1,012 1,030 1,033 1,034 1,036 1,043 1,058		Изопропиловый эфир <i>N</i> -ТФА (<i>L</i> -валил) ₂ - <i>L</i> -валина (I) в смеси с изопропиловым эфиром <i>N</i> -ТФА- <i>L</i> -валил- <i>L</i> -валина (II) ⁸⁴ Стекланный капилляр 70 м×0,25 мм; 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140° С (результаты даны в той же последовательности) <i>N</i> -ТФА- <i>трет</i> -бутиловые эфиры <i>D</i> - и <i>L</i> -аланина		
<i>D</i> - и <i>L</i> -валина	0,957 0,977 0,981 0,983 0,987 1,000 1,025			1,288 1,269 1,242 1,239 1,216 1,214 1,205 1,206 1,203 1,187 1,180 1,179 1,176 1,165 1,156 1,159 1,154 1,142 1,139	$X^* = 0,42$ $X = 0,42$ $X = 0,28$ $X = 0,42$ $X = 0,55$ $X = 0$ $X = 0,28$ $X = 0,42$ $X = 0,55$ $X = 0$ $X = 0,28$ $X = 0,42$ $X = 0,55$ $X = 0$ $X = 0,28$ $X = 0,42$ $X = 0,55$ $X = 0$ $X = 0,28$

* $X = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$; n_1 и n_2 — число молей фаз (I) и (II).

аминокислот более стабильны⁸⁵, факторы разделения для них выше, времена удерживания меньше, чем для соответствующих N-ТФА-производных⁹².

В литературе приводились теплоты взаимодействия энантиомеров с дипептидными фазами^{84, 88, 90, 94}. Так, например, $\Delta(\Delta H)$ для энантиомеров N-ТФА изопропиловых эфиров ряда аминокислот на циклогексильном эфире N-ТФА-*L*-норвалил-*L*-норвалина имеют значения⁸⁸:

АК	Аланин	α -Аминомасляная	Валин	Норвалин	Лейцин	Изолейцин	трет-Лейцин
$-\Delta(\Delta H) \pm$ $\pm 5, \text{ кал/моль}$	342	339	302	293	366	348	156

В табл. 4 приведены производные аминокислот и фазы, применяющиеся при энантиомерном анализе аминокислот на диссимметрических фазах.

Резюмируя опубликованные к настоящему времени результаты по использованию диссимметрических фаз для разделения аминокислот, следует особо отметить некоторые обстоятельства.

1. Различия избыточных энергий взаимодействия энантиомерных производных аминокислот с известными из литературы фазами имеют значения от нескольких *кал/моль* до 150 *кал/моль* в зависимости от выбранной пары энантиомер — фаза и температуры опыта (рассчитано из параметров удерживания)⁹³.

2. Эффективное разделение энантиомеров аминокислот за приемлемое время возможно, несмотря на большие значения $\alpha_{L/D}$ только на капиллярных колонках (см. табл. 4).

3. Достижение эффективного разделения энантиомерных пар во многих случаях сопровождалось наложением пиков некоторых аминокислот, принадлежащих к разным энантиомерным парам, несмотря на большое число испытанных фаз (табл. 4).

4. Большинство фаз имеет, к сожалению, узкий рабочий температурный диапазон (нижняя граница диапазона определяется температурой плавления фазы, а верхняя — ее летучестью или нестабильностью).

Газохроматографическое определение энантиомерного состава сложных смесей позволяет решать и частную задачу — определение энантиомерной чистоты. В обоих случаях ГХ имеет безусловное преимущество перед поляризацией и ЯМР. Высокоэффективный разделительный метод в принципе не ограничивает числа компонентов анализируемой смеси как оптически активных, так и неактивных.

III. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный анализ характеризуется такими параметрами, как точность, воспроизводимость, линейный диапазон анализируемых концентраций, предел чувствительности. Для многостадийной аналитической процедуры (а именно такой процедурой является ГЖХ аминокислот) эти параметры будут определяться парциальными параметрами каждой стадии: выделения аминокислот из природной или синтетической смеси, получения производных и собственно хроматографического разделения и определения площадей хроматографических пиков. Установлению этих параметров посвящено сравнительно мало работ^{24, 95–102}, причем выполненные исследования в основном касаются разделения ТАБ по методу Стефановича — Герке^{12, 13}, ТМС-производных и получения соответствующих производных.

а. Воспроизводимость анализа

Литературные данные по этому вопросу наиболее многочисленны и противоречивы (приводятся значения вариационных коэффициентов \bar{w} от 0,02 до 35%). Это не является неожиданностью — данные по воспроизводимости ионообменного анализа АК также имеют большой разброс.

Наибольшую воспроизводимость (до 0,02%, интегратор Вариан 480) имеют результаты разделения энантиомеров АК в виде их N-ТФА-изопропиловых эфиров на N-ТФА-циклогексильном эфире *L*-валил-*L*-валина⁹⁵ в условиях изотермического разделения на капиллярных колонках, т. е. в условиях, обеспечивающих наилучшие отношения сигнал/шум и сигнал/дрейф при достаточно полном разделении пиков и равной химической стабильности и летучести разделяемых компонентов.

Воспроизводимость разделения АК в виде ТАБ несколько хуже. По данным Витта и др.²⁴, разделение ТАБ двенадцати аминокислот на стеклянной колонке длиной 3 м со стабилизированным ПЭГА (0,58%) имеет $\bar{w}=0,17\%$ отн. (интегратор Инфотроникс CRS-100), причем эта ошибка (как и ошибка разделения энантиомеров) зависит от количества вводимой в хроматограф пробы (см. раздел (в) настоящей главы). По данным Герке⁹⁶, средняя хроматографическая воспроизводимость для девятнадцати АК, полученная из трех параллельных определений, составляла 1,3%.

Хроматографическая воспроизводимость разделения ТМС-производных по данным Герке³³ составляет 1,1% отн. (для двадцати АК).

Тальботтом и др.⁹⁷ изучена воспроизводимость калибровочных коэффициентов при анализе ТАБ и показано, что калибровочные коэффициенты меняются при переходе от одной колонки к другой (даже с одинаковой фазой). Так, для треонина значения калибровочного коэффициента отличались друг от друга больше чем в 2,5 раза. Причина этого, возможно, в том, что авторы не достигли полного разделения ТАБ.

Несомненно, что зависимость калибровочных коэффициентов от свойств колонки может быть уменьшена в условиях унифицированной процедуры приготовления колонок и повышения эффективности разделения. По нашим данным (внутренний стандарт — α -аминооктановая кислота), значения калибровочных коэффициентов для большинства аминокислот меняются при переходе от одной колонки с ПЭГА к другой не более, чем на 3%, и только для треонина и серина они возрастают до 10%. Стабильность значений калибровочных коэффициентов достигалась воспроизводимым приготовлением колонок и их продолжительным кондиционированием (не менее 60 часов при 190–200° в токе He).

Воспроизводимость конверсии и степень рацемизации при получении производных для энантиомерного анализа могли быть изучены на основании данных конечной процедуры — газохроматографического разделения.

Наилучшая процедура получения ТАБ АК (прямая этерификация — ацилирование) состоит в следующем. Сухая смесь АК (от 2 мг до 50 мг всех АК) заливается 3*N* раствором HCl в тщательно обезвоженном *n*-бутиловом спирте и нагревается при 100°С в течение 15–35 мин. Избыток реагента и вода отгоняются на ротаторном испарителе или в токе чистого азота, причем для удаления остатков воды смесь дважды упаривают с безводным хлористым метиленом. Ацилирование проводится 10%-ным раствором трифторуксусного ангидрида в хлористом метиле при температуре до 150°С в течение 5–60 мин. Широкий диапазон условий связан с различной реакционной способностью и стабильностью различных АК. Так, если смесь не содержит изолейцина, то для этерифика-

ции достаточно 15 мин (при этом также достигается максимальный выход *n*-бутилового эфира триптофана); для количественной этерификации изолейцина необходимо увеличить время реакции до 35 мин. С другой стороны, *n*-бутиловые эфиры некоторых АК (особенно, гистидина) количественно трифторацетилируются с достаточной скоростью лишь при 100–150°С¹³.

Литературные данные по получению ТАБ гистидина противоречивы (см., например, обзор⁶). Неизвестна даже структура летучего производного. В связи с трудностью прямого определения гистидина в виде ТАБ, было предложено предварительно превращать его путем озонолиза в аспарагиновую кислоту⁶. В тех же целях аргинин может быть гидролизован в присутствии аргиназы в орнитин⁶.

Другие осложнения при количественном анализе ТАБ связаны с тем, что длительная этерификация, необходимая для полной конверсии всех двадцати белковых АК в их эфиры, сопровождается частичным осмолением триптофана. Поэтому режим этерификации должен быть строго стандартизован по концентрации и количеству реагентов, продолжительности реакции и температуре⁹⁸.

По нашим данным, калибровочные коэффициенты для большинства ТАБ АК не изменяются при хранении полученных производных (комнатная температура) в присутствии 2%-ного раствора ТФА в CH_2Cl_2 в течение двух недель; однако ТАБ метионина при этом быстро разрушается. Разбавленные водные растворы метионина также нестабильны. Поэтому смеси, содержащие метионин, следует анализировать быстро.

Наряду с жесткими требованиями к газовому хроматографу (цельностеклянный разделительный тракт, минимальный контакт с металлом на пути газов между концом колонки и пламенем, абсолютно сухой и фильтрованный газ-носитель), предлагается обращать особое внимание на чистоту посуды, качество роторного испарителя, который не должен содержать металлических частей, и чистоту используемых при синтезе производных реактивов и газов.

Витт и др.²⁴ сообщают, что пробы, не содержащие гистидина и аргинина, могут количественно и с хорошей воспроизводимостью ацилироваться при комнатной температуре при двукратной обработке трифторуксусным ангидридом (сначала в виде 10%-ного, а затем 2%-ного раствора в CH_2Cl_2) с промежуточной отгонкой образующейся CF_3COOH с растворителем на роторном испарителе.

Этерификация АК изопропиловым спиртом идет значительно медленнее, чем *n*-бутиловым. На рис. 1 приведены кинетические кривые этерификации ряда АК⁹⁵, из которых следует, что полной конверсии при получении этих производных практически не происходит. Авторы рекомендуют ограничивать время этерификации четырьмя часами, поскольку при более длительной этерификации изменение энантиомерного состава смеси вследствие рацемизации становится соизмеримым со случайной хроматографической ошибкой.

В случае общего аминокислотного анализа воспроизводимость при получении производных характеризует возможность анализа смесей, не требующих предварительной очистки. Наилучшее значение воспроизводимости по сумме двух стадий, приводимое в литературе²⁴, составляет величину $\bar{w}_{n=4, m=12}=0,7\%$. По данным Герке и сотр.⁹⁶, эта величина для девятнадцати АК составляла $\bar{w}_{n=6, m=19}=1,5\%$. Если получению производных должна предшествовать ионообменная очистка, воспроизводимость анализа еще более ухудшается. Впрочем, это уже не «вина» газовой хроматографии — очистка является стандартной процедурой и при анализе методом ионообменной хроматографии.

Герке с сотр.^{96, 98} показали, что ионообменная очистка, необходимая для выделения чистой аминокислотной фракции для последующего аминокислотного анализа, сопряжена с частичной потерей ряда аминокислот. Эти же авторы установили, что аргинин полностью теряется при некоторых видах очистки. Воспроизводимость ГХ-анализа синтетических и природных смесей (моча, кровь), полученная из трех параллельных определений, при этом составляла $\sim 1,5\%$ для синтетических смесей и

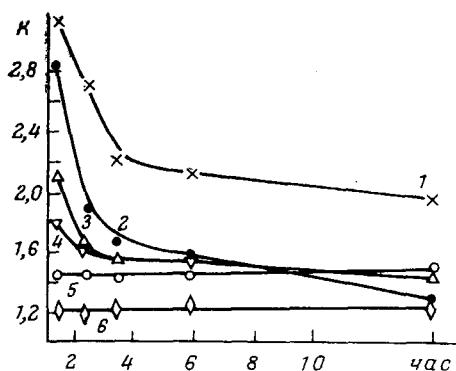


Рис. 1. Зависимость величины калибровочных коэффициентов N-ТФА-изопропиловых эфиров аминокислот от времени этерификации; $K = S_{ст} \cdot m_i / m_{ст} \cdot s_i$ (m_i — навеска АК, $m_{ст}$ — навеска стандарта, s_i — площадь пика АК, $s_{ст}$ — площадь пика стандарта); 1 — изолейцин, 2 — валин, 3 — треонин, 4 — лейцин, 5 — глицин, 6 — аланин

1,5—2,2% — для природных. Воспроизводимость ионообменной хроматографии тех же образцов для семнадцати АК составляла 5—12%. Витт с сотр.²⁴ получили близкие к указанным значения воспроизводимости: 1,1% — для первого случая и 1,3% — для второго (для двенадцати АК). Очевидно, что воспроизводимость ионообменной очистки ухудшается в случае сильно загрязненных (природных) смесей.

б. Точность анализа

Строго говоря, решение проблемы о точности связано с наличием эталонов или эталонных процедур. Для работы методом эталонирования нужны эталоны, чистота которых приближается к воспроизводимости метода, поэтому ионообменная хроматография не может служить эталоном при определении точности ГХ-анализа аминокислот.

По всей видимости, придется принять, что сама газовая хроматография и является искомой эталонной процедурой. В работе Витта и др.⁹⁵ рассматривается возможность эталонирования, основанного на равенстве концентраций анализируемых соединений. К числу таких случаев относится, например, равенство концентраций энантиомеров в рацемических смесях. Было показано, что при хроматографировании летучих производных D-аминокислот в изотермических условиях наблюдается систематическая ошибка, зависящая от отношения дисперсий и высот пиков, т. е. от концентрации. Эта ошибка связана с порогом интегрирования — более острый пик интегрируется полнее пологого. В изученных случаях величина ошибки составляла 0,02—0,3% отн.

При использовании метода внутреннего стандарта (т. е. при общем АК-анализе) систематическая ошибка будет определяться чистотой применяемых эталонов и используемой рабочей точкой внутри диапазона линейности метода.

При значительных систематических ошибках, заведомо перекрывающих неопределенности в составе эталонов (а именно этот случай характерен для стадий получения производных и, особенно, очистки на ионообменных колонках), величина систематических ошибок может быть легко определена из небольшого числа экспериментальных данных. Эта

ошибка (средняя для семнадцати АК), установленная на примере анализа стандартной смеси в присутствии аминокислот мочи с использованием ионообменного удаления белка, составила 3,24% отн.⁹⁶

По-видимому, величина ошибки может быть уменьшена, если распространить калибровку на весь анализ целиком, включая и стадию очистки.

В заключение рассмотрим вопрос об анализе АК в случае перекрывающихся пиков. Обычное ГХ-разделение ТАБ аминокислот дает хорошо разрешенную хроматограмму для 18—20 природных АК, и поэтому оно пригодно для точного количественного анализа. Другие методы, особенно разделение энантиомеров, где количество пиков увеличивается вдвое, указанной особенностью не обладают. Суммарное разрешение в данном случае зависит не от селективности разделения внутри энантиомерных пар, а от разделения компонентов, соответствующих разным АК, т. е. связано лишь с эффективностью применяемой колонки. Причина этого в том, что аминокислотные смеси не являются гомологическими смесями, и поэтому объемы удерживания какого-либо из энантиомеров одной АК могут лежать близко к объемам удерживания других АК. Вероятность такой ситуации увеличивается с ростом числа аминокислот, присутствующих в смеси. Для количественного анализа таких частично разрешаемых смесей было предложено⁹⁵ проводить одновременно ГХ-анализ на колонке с обычной (не диссимметрической) стационарной фазой или использовать уже имеющиеся данные по аминокислотному (но не энантиомерному) составу анализируемых смесей.

Тогда из экспериментально показанного равенства относительной чувствительности пламенно-ионизационных детекторов следует, что

$$s_L + s_D = \omega s^*,$$

где $\omega = s_{ст}/s_{ст}^*$ — коэффициент пропорциональности, сохраняющий свое значение для всех компонентов данного хроматографического опыта; s^* — площади пиков на колонке с диссимметрической фазой; $s_{ст}$ — площадь пика стандарта; s — площади пиков на колонке с оптически неактивной фазой.

Отсюда

$$S_L^* = \omega s - s_D^*.$$

Систематическая ошибка в этом случае зависит от точности определения площадей пиков в условиях хроматографирования на обычной фазе.

в. Линейный диапазон и пределы чувствительности

В зависимости от величины анализируемых концентраций, ГХ-анализ АК в виде ТАБ¹³ осуществляется на уровне 2 мкг — 50 мг. При этом величина вводимой в хроматограф пробы варьируется от 0,125 до 500 мкг.

В литературе по ГХ аминокислот приводятся хроматограммы⁹⁷, из которых следует, что с применением пламенно-ионизационного детектора можно получить индивидуальные пики для 6—8 нм аминокислот, вводимых в виде ТАБ в газовый хроматограф. Для повышения отношения сигнал/шум в работе⁹⁷ использовался сброс основной массы паров растворителя при помощи вентиля, расположенного между аналитической и форколонкой.

По данным¹¹⁰, минимально определяемое количество АК (в виде ТАБ) при использовании детектора электронного захвата составляет 1—50 пикограмм (очевидно, при очень узком линейном диапазоне).

Установлено²⁴, что систематические и случайные ошибки при ГХ-анализе ТАБ имеют экстремальную точку (см. рис. 2), т. е. существует оптимальная в смысле точности и воспроизводимости концентрация анализируемой пробы. По-видимому, ошибки, лежащие в области концентраций, меньших оптимальной, вызываются помехами (шум и дрейф колонок), тогда как правая ветвь кривой обязана своим происхождением ухудшению разрешения пиков с ростом концентраций.

Из рис. 2 следует, что линейный диапазон метода определяется допустимыми концентрациями, и, наоборот, точность и воспроизводимость

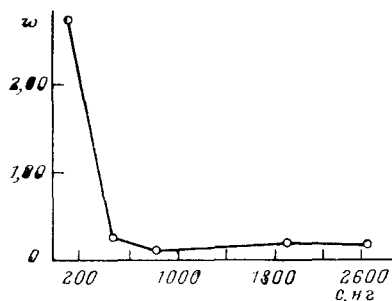


Рис. 2. Изменение воспроизводимости калибровочных коэффициентов аминокислот с концентрацией вводимой пробы

определяются принятым линейным диапазоном и могут быть повышены, если работать в узкой зоне концентраций, лежащей в области экстремальных значений. По-видимому, широкий разброс приводимых в литературе значений по точности и воспроизводимости вызван тем, что исследователи не всегда работали в концентрационной зоне, соответствующей оптимуму, а также не всегда добивались хорошего разрешения и достаточно высокого отношения сигнал/шум. При некорректной работе кривая зависимости ошибок от концентрации лежит выше и имеет более острый характер.

Эти ограничения касаются не только точности и воспроизводимости, но и пороговой чувствительности: мы еще не умеем количественно выделять аминокислоты и получать их производные на уровне 10^{-10} г.

Очевидно, что и для процессов получения производных и выделения АК из природных смесей также должны существовать зависимости точности и воспроизводимости от концентраций, причем в области малых концентраций возможен быстрый рост ошибок вследствие окисления и остаточной сорбции на стекле и материалах колонок¹⁰¹. Следует признать, что в многостадийной процедуре, включающей газовую хроматографию, лимитирующими и наименее разработанными стадиями являются стадии, предшествующие самой газовой хроматографии.

Из приведенных данных следует, что точность и воспроизводимость газовой хроматографии как количественного метода, по крайней мере, на порядок выше, чем поляриметрии и ЯМР для случаев, наиболее благоприятных для этих методов (смесь двух энантимеров, определение энантиомерной чистоты). То же можно сказать и о пороге чувствительности рассматриваемых методов.

IV. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

В первых работах по газовой хроматографии АК (см., например¹³) анализ природных объектов (обычно кислых гидролизатов белков) выполнялся, главным образом, ради доказательства применимости и надежности метода, причем критерием служило соответствие результатов данной ионообменной хроматографии. В результате многочисленных исследований стало ясно, что анализ АК методом ГЖХ в высокой степени точен и воспроизводим, и в настоящее время появляется все больше работ, в которых ГЖХ применяется как самостоятельный метод анализа, не требующий проверки путем сравнения с другими методами. Более

того, некоторые исследования оказались возможными (или, по крайней мере, были сильно облегчены) только при использовании для анализа АК универсального и высокочувствительного газохроматографического метода.

Мы постараемся показать на ряде характерных примеров современный уровень работ, использующих для анализа АК метод ГЖХ, и возможности этого метода.

В 1971 г. Пеллиццари и др.¹³ применили ГЖХ для анализа АК плазмы крови в виде *N*-трифторацетатов *n*-бутиловых эфиров и провели статистическую оценку результатов. Авторы показали, что для анализа требуется всего лишь 0,2 мл плазмы, а воспроизводимость результатов вполне удовлетворительна для клинического применения, например, для диагностики нарушений обмена веществ (особенно в случае болезней, связанных с нарушением аминокислотного состава белков).

Последующие работы подтвердили перспективность применения ГЖХ для анализа АК в крови, моче и в других биологических жидкостях при клинических исследованиях.

Так, например, изучалась динамика содержания аминокислот в крови пациентов, оперированных по поводу рака желудка, при парентеральном питании⁶⁹. Аминокислоты определялись в плазме крови до парентерального введения препарата Аминозол (1 г на 1 кг веса тела в виде 10%-ного раствора) и по мере введения. Оказалось, что сумма свободных анализируемых аминокислот в плазме крови у большинства исследованных больных уменьшается по мере введения в кровь аминокислотного препарата, т. е. введение смеси аминокислот в кровь резко ускоряет процесс их ассимиляции. Плазма крови больных содержала аминокислоты исключительно *L*-конфигурации.

Возрастающее применение ГЖХ аминокислот в биологических исследованиях связано, не в последнюю очередь, с установлением аминокислотного состава и первичной структуры пептидов и белков. Мы уже отмечали⁴⁶ успехи ГЖХ тиогидантоиновых производных АК — продуктов ступенчатой «считывающей» деградации белков по методу Эдмана. Более высокая чувствительность ГЖХ по сравнению с тонкослойной хроматографией позволяет работать с меньшим количеством вещества и устанавливать структуры более высокомолекулярных белков.

Еще большие преимущества газовая хроматография может дать при анализе состава молекул таких сложных веществ, как липопротеины, комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, гликопротеины и т. п. Например, Занетта и Винсендон¹⁴ показали, что в случае гликопротеинов на одном и том же образце можно выполнить анализ сначала углеводной, а затем белковой части. Универсальность метода ГЖХ оказывается весьма удобной и при анализе продуктов метаболизма АК. Так, Альбро и др.¹⁰³ с помощью газовой хроматографии одновременно определяли ~30 метаболитов тирозина и триптофана, представляющих собой вещества весьма различной химической природы.

Для иллюстрации возможностей ГЖХ в сложных биологических исследованиях, связанных с определением состава АК, укажем на работу Батлера и др.¹⁰⁴, применивших этот метод для анализа АК, присоединенных к транспортной РНК.

Анализ АК с помощью ГЖХ успешно применяется в геохимических и палеонтологических исследованиях. Так, Поклингтон¹⁰⁵ использовал этот метод для количественного анализа АК в водах северной Атлантики, а Гарднер и Ли¹⁰⁶ — в озерной воде. В обоих случаях концентрация АК составляла ~10⁻⁸ моль/л (каждой АК), и ГЖХ зарекомендовала себя как удобный и точный метод анализа. Группа Герке¹⁰ выполнила

анализ АК в водном экстракте образца, взятого из древнейшей формации Онвервахт (возраст 3,4 млрд. лет). С высокой степенью надежности ГЖХ продемонстрировала наличие АК на уровне 10^{-8} — 10^{-9} г. Если же учесть, что с детектором электронного захвата удалось снизить¹⁰⁰ минимально детектируемое количество АК до 1—50 пикограммов, то становится ясным преимущество ГЖХ для выполнения анализов АК на ультрамикроруровне по сравнению с другими методами. Близким пределом чувствительности обладает новый масс-спектрометрический метод деструктурирования, обычно называемый «масс-фрагментацией». Эта техника уже была применена к ГЖ-анализу АК в биологических соединениях¹⁰⁷ и в почве.

Уникальная возможность определять методом ГЖХ энантиомерный состав смесей АК была использована при анализе ископаемых коллаге-на¹⁰⁸, морских донных отложений¹⁰⁹, а также энантиомерного состава АК плазмы крови и гидролизатов и автолизатов пекарских дрожжей¹¹⁰.

ГЖХ аминокислот, безусловно, найдет широкое применение при исследованиях, связанных с происхождением жизни на Земле и возможностью жизни на других небесных телах. Так, Ролен и др.¹¹¹ применили этот метод для анализа АК, образующихся в процессе фотолиза газовой смеси, моделирующей примитивную атмосферу Земли. Они показали, что за один хроматографический опыт совместно с двадцатью основными белковыми можно анализировать еще, по крайней мере, восемнадцать небелковых АК, что особо важно для исследования химической эволюции и дает газовому хроматографу серьезное преимущество перед аминокислотным анализатором.

Метод газовой хроматографии был использован для поиска АК и других органических веществ в лунной пыли, доставленной американскими космическими кораблями «Аполлон»^{19, 100}, и мы полагаем, безусловно, будет применяться для анализа образцов грунтов планет.

В заключение отметим, что литература по применению анализа АК методом ГЖХ весьма обширна. И это показывает, что рассмотренный метод в достаточной мере доказал свою надежность и пригодность как для выполнения обычных задач аминокислотного анализа, так и для решения особых проблем, требующих универсального, высокочувствительного, точного и воспроизводимого метода анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Potteau, Bull. Soc. chim. France, 1965, 3747.
2. C. Landault, G. Guichon, Там же, 1967, 3985.
3. K. Blau, Biomedical Applications of Gas Chromatographie, v. 2, Plenum Press, N. Y., 1968, p. 1.
4. P. Neri, P. Tarli, Quad. Sclavo Diagn., 5, № 1 (1969).
5. Vaclav Marek, Chem. Listy, 68, 250 (1974).
6. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков, «Мир», М., 1974, стр. 93.
7. E. Fischer, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 34, 433 (1901).
8. E. Bayer, K.-H. Reuther, J. Born, Angew. Chem., 69, 640 (1957).
9. E. Bayer, Gas Chromatography 1958, by D. H. Desty, Acad. Press, N. Y., 1958, p. 333.
10. A. Islam, A. Darbre, J. Chromatogr., 43, 11 (1969).
11. C. Zomsely, G. Marco, E. Emery, Analyt. Chem., 34, 141 (1962).
12. A. Darbre, A. Islam, Biochem. J., 106, 23 (1968).
13. C. W. Gehrke, Don Roach, R. W. Zumwalt, D. L. Stalling, L. L. Wall, Quantitative Gas-Liquid Chromatographie of amino acids in proteins and biological substances, 1968, Columbia, Missouri.
14. J. P. Zanetta, G. Vincendon, J. Chromatogr., 76, 91 (1973).
15. L. Birkofer, M. Donike, Там же, 26, 270 (1967).
16. M. G. Horning, A. M. Moss, E. A. Bouchev, Anal. Lett., 1, 311 (1968).
17. W. Steglich, U. Austel, Angew. Chem., 79, 155 (1967).
18. C. W. Gehrke, K. Leimer, J. Chromatogr., 53, 195 (1970).

19. J. Rash, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, K. C. Kuo, K. A. Koenfolden, G. L. Stalling, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 444 (1972).
20. C. W. Gehrke, G. Roach, *Separ. Sci.*, **2**, 101 (1967).
21. C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, L. Wall, *J. Chromatogr.*, **37**, 398 (1968).
22. C. W. Gehrke, F. Sharokhi, *Anal. Biochem.*, **15**, 97 (1966).
23. M. Stefanovic, B. L. Walker, *Anal. Chem.*, **39**, 710 (1967).
24. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, Е. А. Пасконова, С. Б. Никитина, В. М. Беликов, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **1974**, 1308.
25. C. W. Gehrke, K. C. Kuo, R. W. Zumwalt, *J. Chromatogr.*, **57**, 209 (1971).
26. C. W. Gehrke, D. Roach, *Anal. Biochem.*, **25**, 109 (1968).
27. G. E. Pollok, *Anal. Chem.*, **38**, 1194 (1967).
28. C. W. Moss, M. A. Lambert, Z. J. Diaz, *J. Chromatogr.*, **57**, 134 (1971).
29. D. Roach, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, Там же, **43**, 311 (1969).
30. J. Jonsson, J. Eyem, J. Sjoquist, *Anal. Biochem.*, **51**, 204 (1973).
31. С. В. Рогожин, Ю. А. Давидович, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **1969**, 977.
32. K. Ruhlmann, W. Guiseke, *Angew. Chem.*, **73**, 113 (1961).
33. C. W. Gehrke, H. Nakamoto, R. W. Zumwalt, *J. Chromatogr.*, **45**, 24 (1969).
34. C. W. Gehrke, R. R. Leimer, Там же, **57**, 219 (1971).
35. K. Ruhlmann, G. Michael, *Symp. Gas Chromatogr.*, Berlin, 1965, German Academic of Science, Berlin, 1965, p. 245.
36. J. F. Klebe, H. Finkleiner, D. H. White, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3390 (1966).
37. J. P. Hardy, S. L. Kerrin, *Anal. Chem.*, **44**, 1497 (1972).
38. J. P. Thenot, E. C. Horning, *Anal. Lett.*, **2**, 519 (1972).
39. B. G. Pettit, G. E. Stoufner, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 735 (1970).
40. B. Blessington, N. L. J. Fiagbe, *J. Chromatogr.*, **68**, 259 (1972).
41. P. W. D. Mitchell, Там же, **76**, 236 (1973).
42. K. M. Williams, B. Halpern, *Anal. Lett.*, **6**, 839 (1973).
43. T. Grahl-Nielsen, E. Solheim, *J. Chromatogr.*, **69**, 366 (1972).
44. J. Z. Siemion, K. Nowak, *Rocz. Chem.*, **34**, 1479 (1960).
45. F. Weygand, *Justus Liebigs. Ann. Chem.*, **658**, 128 (1962).
46. P. Husek, 4-й Междунар. симпозиум по развитию и применению хроматографии, Братислава, 1973, стр. 25.
47. H. E. Simmons, D. W. Willey, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2288 (1960).
48. F. Weygand, M. Fres, *Z. Anal. Chem.*, **205**, 407 (1964).
49. J. J. Pisano, I. J. Bronzert, H. B. Brewer, *Anal. Biochem.*, **45**, 43 (1972).
50. J. Rosmus, Z. Deyl, *J. Chromatogr.*, **70**, 221 (1972).
51. J. Eyem, J. Sjoquist, *Anal. Biochem.*, **52**, 255 (1973).
52. J. Casanova, E. Corey, *J. Chem. Ind (London)*, **1961**, 1964.
53. F. Weygand, A. Prox, I. Schmidhammer, W. Konig, *Angew. Chem. Intern. Edn*, **2**, 183 (1963).
54. I. Gault, H. Felkin, *Bull. Soc. chim. France*, **1965**, 742.
55. B. Feibush, E. Gil-Av, *J. Gas Chromatogr.*, **5**, 257 (1967).
56. R. Charles, G. Fisher, E. Gil-Av, *Israel J. Chem.*, **1**, 234 (1963).
57. B. Halpern, C. W. Westley, *Chem. Commun.*, **1965**, 246.
58. J. P. Guette, A. Horeau, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 3049.
59. G. E. Pollock, V. J. Oyama, R. D. Johnson, *J. Gas Chromatogr.*, **3**, 174 (1965).
60. G. E. Pollock, A. H. Kawachi, *Anal. Chem.*, **40**, 1356 (1968).
61. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, В. М. Беликов, *ЖАХ*, **21**, 227 (1966).
62. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, И. П. Гудкова, В. М. Беликов, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 2575.
63. E. Gil-Av, R. Charles-Sigler, G. Fischer, D. Nurok, *J. Gas. Chromatogr.*, **4**, 51 (1966).
64. E. Gil-Av, R. Charbs, G. Fischer, *J. Chromatogr.*, **17**, 408 (1965).
65. J. W. Westley, B. Halpern, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **40**, 2046 (1968).
66. J. W. Westley, B. Halpern, B. L. Karger, Там же, **40**, 2046 (1968).
67. G. E. Pollock, V. J. Oyama, *J. Gas Chromatogr.*, **4**, 126 (1966).
68. R. Charles-Sigler, E. Gil-Av, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 4231.
69. М. Б. Сапоровская, Кандид. диссерт., ИНЭОС АН СССР, М., 1974.
70. B. Halpern, J. W. Westley, *Chem. Commun.*, **1965**, 421.
71. F. Raulin, B. N. Khare, *J. Chromatogr.*, **75**, 13 (1973).
72. H. C. Rose, R. L. Stern, R. A. Karger, *Anal. Chem.*, **38**, 469 (1966).
73. B. Halpern, L. F. Chew, J. W. Westley, Там же, **39**, 399 (1967).
74. J. W. Westley, B. Halpern, *J. Org. Chem.*, **33**, 3978 (1968).
75. B. Halpern, J. W. Westley, J. Wrehenhagen, J. Lederberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 710 (1965).
76. J. C. Dabrowiak, D. W. Cook, *Anal. Chem.*, **43**, 791 (1971).
77. М. Я. Карпейский, С. В. Шляпников, Н. С. Оселдчик, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 3885.
78. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler, Там же, **1966**, 1009.

79. E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler, J. Gas Chromatogr., ed. A. B. Littlewood, Institute of Petroleum, London, 1967, p. 227.
80. B. Feibush, E. Gil-Av, T. Tamari, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2, 1197 (1972).
81. B. Feibush, E. Gil-Av, Tetrahedron Letters, 1967, 3345.
82. J. A. Corbin, L. B. Rogers, Anal. Chem., 42, 974 (1970).
83. J. A. Koenig, W. Parr, E. Lichtenstein, E. Bayer, J. Oro, J. Chromatogr. Sci., 8, 173 (1970).
84. B. Feibush, E. Gil-Av, Tetrahedron Letters, 1970, 1361.
85. W. Parr, C. Yang, E. Bayer, E. Gil-Av, J. Chromatogr. Sci., 8, 591 (1970).
86. J. A. Corbin, J. B. Rhoad, L. B. Rogers, Anal. Chem., 43, 327 (1971).
87. W. Parr, P. Howard, Chromatographia, 1971, 162.
88. W. Parr, P. J. Howard, J. Chromatogr., 67, 227 (1972).
89. W. Parr, P. J. Howard, Angew. Chem., 84, 586 (1972).
90. K. Gromman, W. Parr, Chromatographia, 1, 18 (1972).
91. B. Feibush, J. Chem. Soc., D1971, 544.
92. W. Parr et al., J. Chromatogr., 50, 510 (1970).
93. S. Nakaparksin, P. Birrell, E. Gil-Av, J. Oro, J. Chromatogr. Sci., 8, 177 (1970).
94. W. Parr, P. Howard, J. Analyt. Chem., 45, 711 (1973).
95. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, Е. А. Пасконова, С. Б. Никитина, В. М. Беликов, Изв. АН СССР. Сер. хим., 1974, 676.
96. R. W. Zumwalt, D. Roach, C. W. Gehrke, J. Chromatogr., 53, 171 (1970).
97. P. Talbot, E. D. Pellizzari, J. H. Brown, R. W. Farmer, L. F. Fabre, J. Chromatogr. Sci., 9, 24 (1971).
98. C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, K. Ruo, J. Agr. Food. Chem., 19, 605 (1971).
99. L. Rauramaa, M. Kreula, Suomer Kemistilehti, 45, 61 (1972).
100. C. W. Gehrke, et al., J. Chromatogr., 59, 305 (1971).
101. П. Кайзер, Успехи хроматографии, «Наука», М., 1972, стр. 93.
102. E. D. Pellizzari, J. H. Brown, P. Talbot, R. W. Farmer, L. F. Fable, Gr., J. Chromatogr., 55, 281 (1971).
103. P. W. Albro, L. Fishbein, Там же, 55, 291 (1971).
104. M. Buttler, A. Darbre, H. R. V. Arnstein, Biochem. Soc. Trans., 1, 610 (1973).
105. R. Pocklington, Analyt. Biochem., 45, 403 (1972).
106. W. S. Cardher, G. F. Lee, Environ. Sci. Technol., 7, 719 (1973).
107. B. Maune, Z. Analyt. Chem., 45, 1073 (1973).
108. J. Gungworth, N. J. Vincken, A. W. Schwartz, Compt. Biochem. Physiol., 47, № 2B, 391 (1974).
109. K. A. Kvenvolden, E. Peterssin, J. Wehmiller, P. E. Hare, Geochim. et cosmochim. acta, 37, 2215 (1973).
110. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, С. Б. Никитина, Е. А. Пасконова, В. К. Садовская, В. М. Беликов, Ж. прикл. биохимии и микробиологии, 3, 481 (1975).
111. Z. Raulin, P. Shapshak, B. N. Khabe, J. Chromatogr., 73, 35 (1972).