

Август

2005

---

**α** УМУЧЭСКИЙ  
НАУЗ

---

Редактор

К.С. Сычев

Рецензенты

Э.Л. Гоголашвили

Л.В. Сапрыкин

С.Н. Сычев

А.В. Удалов

Е.К. Федоров

# Прямой анализ бетаинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ

Л.В. Сапрыкин <sup>1)</sup>, А.А. Сердан <sup>2)</sup>, Л.В. Сапрыкина <sup>3)</sup>

1) ТНЦ "Кубань-Юг", L.V.Saprykin@kragaz.ru

2) МГУ, химический факультет

3) ТНЦ "Кубань-Юг", L.V.Saprykina@kragaz.ru

## 1. Статья

2. А.В. Удалов. Рецензия на статью

3. М.И. Евгеньев. Рецензия на статью

4. Комментарии редактора

## Уважаемые коллеги!

В биологических циклах большинства живых организмов немаловажную роль играет ряд таких высокополярных и полифункциональных соединений как бетаины.

По химической структуре бетаины представляют собой производные аминокислот, аминогруппы которых предельно метилированы до образования четырехзамещенных катионов аммония и образующих в определенном диапазоне рН с карбоксильной группой внутренние соли.

Роль этих веществ в регулировании и обеспечении основных функций организма животных и человека трудно переоценить. Достоверная информация о составе и количестве этих и аналогичных им соединений, например, в плазме крови - крайне необходима для ранней диагностики многих заболеваний, контроля за лечением и коррекции различного рода патологий. Если добавить сюда целый ряд весьма действенных лекарственных препаратов аналогичного строения, требующих для их внедрения проведения фармакокинетических исследований, то проблема достаточно быстрого и точного определения высокополярных веществ в биопробах видится весьма актуальной.

Сложность решения этой задачи определяется тем, что все бетаины и их аналоги традиционно крайне неудобны для ВЭЖХ анализа, очень лабильны и не допускают сколь ни будь жестких воздействий при проведении пробоподготовки. В настоящее время высокая полярность и прозрачность в УФ диапазоне спектра большинства этих соединений, а также крайне сложный состав матрицы обуславливает применение схем анализа, включающих очистку и концентрирование, а кроме того - дериватизацию аналитов в более удобные для хроматографирования вещества. Многостадийные подготовительные операции не только недопустимо снижают экспрессность проведения такого анализа, но и неизбежно приводят к потерям и искажению состава анализируемых объектов, что ощутимо снижает информативность и саму целесообразность эксперимента.

Такая ситуация побуждает исследователей искать новые методические приемы, позволяющие с одной стороны - упростить и ускорить подобные аналитические работы, а с другой - добиться приемлемых метрологических характеристик и чувствительности определения.

В данной работе предпринята попытка прямого определения некоторых важнейших бетаинов и подобных им веществ в плазме крови в нетрадиционном режиме жидкостной хроматографии как на обычном силикагеле, так и на специально разработанном для таких разделений оригинальном сорбенте на основе силикагеля.

Возможно, в дальнейшем, этот методический подход может оказаться полезным при постановке методик анализа других веществ с аналогичными структурой и свойствами.

В качестве аналитов были выбраны соединения, приведенные в таблице 1.

Это важные бетаины, содержание и соотношение которых наиболее полно характеризует состояние и энергетический потенциал организма, а соединение 5 является синтетическим лекарственным препаратом, обладающим ярко выраженными кардиопротекторными и иммуностимулирующими свойствами. Как видно из структуры, все перечисленные вещества являются очень полярными и малореакционноспособными для деривации, не содержат хромофорных групп, а значит - обладают заметным поглощением только в коротковолновой области УФ-спектра.

Высокая полярность сорбатов заставила практически сразу отказаться от использования классического обращенно-фазового варианта ВЭЖХ, поскольку при его использовании не удалось добиться сколь ни будь приемлемого удерживания и разделения изучаемых веществ. Ион-парный вариант так же оказался малоприменим для наших целей, ввиду аномально большой размытости и асимметрии пиков.

1	Глицерин-бетаин (N, N, N – триметиламиноацетат)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$
2	β- аланин - бетаин (3-(N, N, N – триметиламино)-пропионат)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$
3	γ-треонин-бетаин (карнитин) (N, N, N – триметиламино)-2-оксибутират	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \quad   \\ \text{CH}_2 \quad \text{OH} \end{array}$
4	Бетаин γ-аминомасляной кислоты (4-(N, N, N – триметиламино)-бутират)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$
5	Милдронат- (N, N, N – триметилгидразиний)-пропионат	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_2 \end{array}$

Таблица 1. Структуры бетаинов

Для разделения указанных сорбатов наилучшие результаты были получены при использовании нетрадиционного режима хроматографии на немодифицированном силикагеле с водосодержащими элюентами. Перспективность использования таких систем именно для анализа полярных и ионогенных веществ уже достаточно давно сомнению не подлежит.

Следует отметить, что наиболее отчетливо преимущества такого режима проявляется при значительных, почти предельных, содержаниях в водно-ацетонитрильных элюентах неорганической соли. Соль может быть практически любая, но нами использовался дигидрофосфат калия, поскольку он является наиболее прозрачным в коротковолновой области УФ спектра и обладает стабилизирующими pH (буферными) свойствами. Последнее качество необходимо для стабилизации условий ионизации аналитов в растворе, от которых напрямую зависит их гидрофильность.

Механизм разделения в данном случае, видимо, достаточно сложен, тем не менее, в качестве рабочей гипотезы мы предположили, что в подобных элюентах кардинальное изменение хроматографических свойств системы реализуется преимущественно за счет вторичного расслоения элюента на поверхности пор сорбента (поровое расслоение). Хроматографическая система при этом становится распределительной и нормально-фазовой, поскольку НЖФ, образующаяся на поверхности сорбента содержит практически только раствор соли в гидратационной пленке воды силикагеля, а подвижная фаза - водно-ацетонитрильный раствор. То есть неподвижная фаза является значительно более полярной, чем подвижная.

Хроматографическое поведение исследуемых сорбатов косвенно подтверждает реализацию именно такого механизма сорбции. Этот режим мы назвали динамически индуцированным разделом фаз (ДИРФ). В плане альтернативных механизмов не исключен при этом и некий минорный вклад конкурентного механизма взаимодействия в системе "сорбент(вода/соль) - сорбат - элюент", аналогичного по своей сути высаливанию сорбатов из водно-органических растворов.

Что интересно, гидрофильные протонные растворители, такие как метанол и этанол ведут себя в этих условиях совершенно по-другому. Это проявляется в изменении порядка выхода изучаемых сорбатов при их сильной размытости на хроматограмме. По этой причине метанол и другие спирты не использовались в качестве самостоятельного органического модификатора в смесях с водой и соевыми растворами.

В процессе разработки методики первым этапом было необходимо определить оптимальные условия хроматографирования бетаинов на колонке с немодифицированным силикагелем. Для этого использовались водные модельные растворы, содержащие все анализируемые вещества на уровне 0,1 мг/см<sup>3</sup>. Исходя из достаточного уровня разделения целевых веществ и приемлемого удерживания их в колонке, оптимальным показал себя элюент, содержащий 70% ацетонитрила в 0,1М растворе фосфатного буфера с pH = 6,2. Хроматограмма модельного раствора приведена на рис. 1.

С увеличением pH удерживание всех бетаинов пропорционально растет, что видимо связано с увеличением их гидрофильности за счет образования в растворе цвиттер-ионов. Тем не менее, при увеличении pH даже до уровня 7,3 очень сильно интенсифицируется растворение силикагеля в колонке, что значительно сокращает срок службы сорбента. Поэтому было выбрано компромиссное значение pH, когда растворение силикагеля протекает в очень незначительной мере.

Удерживание бетаинов в режиме ДИРФ зависит от содержания ацетонитрила в элюенте весьма сложным образом, но, начиная с концентрации 40%,  $K'$  возрастает пропорционально количеству ацетонитрила в элюенте. Приемлемые значения коэффициента емкости достигаются в интервале 60 - 75%. И именно в этом интервале проявляется

Таблица 2. Зависимость коэффициента удерживания б-аланин - бетаина от концентрации ацетонитрила.

Концентрация ацетонитрила, об. %	Фактор емкости, $k'$
1.0	0.7
10.0	0.9
20.0	1.0
30.0	1.1
40.0	1.2
50.0	2.0
60.0	3.4
70.0	9.0

одна из особенностей режима ДИРФ - аномально высокая чувствительность удерживания сорбатов к составу элюента, что потребовало дополнительных мер по стабилизации содержания ацетонитрила в подвижной фазе.

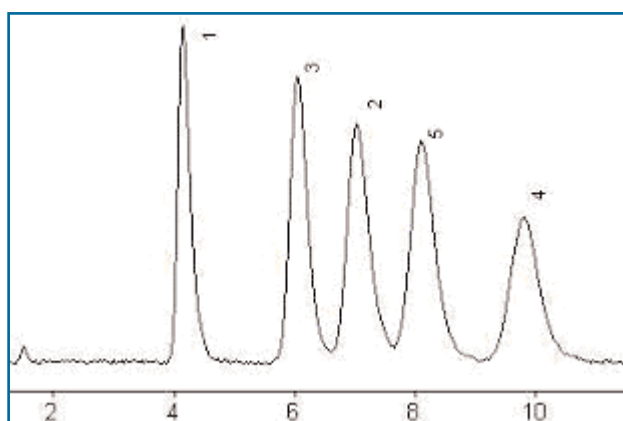


Рисунок 1. Хроматограмма модельной смеси бетаинов (по 0,1 мг/см<sup>3</sup> каждого).

Хроматограф: Милихром 4, УФ детектирование 198 нм, колонка: 2x80 мм, заполнена Separon SGX 5 мкм; элюент: 70% ацетонитрила в 0,1М фосфатном буфере, pH 6,2. Нумерация компонентов соответствует таблице 1

Следующим этапом работы стало определение концентрационного предела обнаружения целевых веществ. Учитывая, что нативное содержание этих аналитов в плазме крови весьма невелико, в качестве рабочей длины волны детектирования было выбрано значение 198 нм, что, безусловно, наложило при дальнейшей работе существенные ограничения, как на перечень возможных к использованию компонентов элюента, так и на их параметры по чистоте. При данной длине волны минимальная обнаруживаемая концентрация составляла 100 - 400 мкг/дм<sup>3</sup>, что примерно в 3 раза выше, чем среднее нативное содержание рассматриваемых бетаинов в крови.

Вопреки ожиданиям, уменьшение длины волны детектирования не привело к ощутимому увеличению чувствительности, что, вероятно, связано с увеличением шумов при детектировании за счет работы фотоприемника в области малой освещенности и связанной с этим перекомпенсацией питающего напряжения ФЭУ.

Учитывая, что кроме целевых компонентов на выбранной длине волны поглощают практически все органические вещества, а плазма крови содержит очень много соединений всего мыслимого спектра полярности и строения, даже такая ценная особенность режима ДИРФ, как полное отсутствие удерживания в колонке относительно неполярных веществ, не решает проблемы мешающего

воздействия аналитической матрицы. А учитывая, что присущие плазме крови такие высокополярные соединения как свободные аминокислоты, полипептиды и белки содержатся в объекте в более значительных концентрациях, чем бетаины, высока вероятность наложения пиков этих веществ на информативную область хроматограммы.

Таким образом, становится вопрос примерно десятикратного концентрирования и обязательной очистки пробы перед введением ее в колонку. Для этих целей как нельзя лучше подходит метод твердофазной экстракции (ТФЭ), завоевавший заслуженную популярность у аналитиков применительно как раз к этим целям.

В качестве сорбционной системы для проведения ТФЭ, как оказалось, оптимально использовать ту же, что и для хроматографирования бетаинов, но в граничных условиях (максимальное удерживание - минимальное удерживание). Соответственно для этих целей были использованы ТФЭ-патрончики "Диапак Sil", объемом 1 мл, производства ЗАО "БиоХимМак". Как следует из названия, патрончики заполнены немодифицированным силикагелем (Силасорб 600).

Для проведения предварительных экспериментов по выбору условий концентрирования и очистки пробы использовался модельный раствор четырех бетаинов в воде. Водный раствор бетаинов разбавлялся ацетонитрилом в 10, 20 и 40 раз для определения оптимального удержания бетаинов на материале патрончика. Подготовленный раствор при помощи медицинского шприца прокачивали через патрончик для ТФЭ.

При проведении предварительных экспериментов в качестве элюирующих растворов использовался 0,2 М раствор дигидрофосфата калия с содержанием ацетонитрила 10 %, поскольку на подобной системе коэффициенты удерживания всех бетаинов минимальны и не превышают 1. Элюирование проводили порциями по 250 мкл, с исследованием каждой фракции на хроматографе. Результаты показали, что при разбавлении исходного раствора в 20 раз процент извлечения по всем бетаинам смеси составляет 96-98%. Для полного извлечения бетаинов оказалось достаточно 1,75 мл смывающего раствора. Далее работы были направлены на оптимизацию состава элюирующего раствора с целью минимизации пробы идущей на анализ. Ранее изученное хроматографическое поведение бетаинов в зависимости от pH (таблица 3) показало, что при pH менее 3 их удерживание существенно падает за счет протонизации карбоксильной группы. По этой причине, в качестве элюирующего раствора были испробованы растворы кислоты. Исходя из ограничений по оптическим свойствам, для эксперимента были выбраны растворы хлорной и фосфорной кислот в диапазоне концентраций от 0,001 до 1М.

Однако, несмотря на буферные свойства элюента, ввод пробы, содержащей значительные количества сильной кислоты, привел к тому, что время удерживания целевых сорбатов в колонке существенно уменьшилось, а время выхода стало невоспроизводимым настолько, что исчезла всякая возможность интерпретации хроматограмм. В силу этих причин, дальнейший эксперимент был направлен на поиски оптимального способа нейтрализации элюата. В качестве веществ для нейтрализации были опробованы карбонат натрия (сода), гидроксид калия и карбонат магния, причем как в сухом виде, так и в виде концентрированных

растворов. Оптимальные результаты были получены при нейтрализации пробы, элюированной с патрона 0,5 М хлорной кислотой сухим карбонатом магния.

При элюировании кислотой, основная часть бетаинов смывалась всего 0,5 мл раствора. Отработанная таким образом методика твердофазной очистки и концентрирования была апробирована на образце крови.

Образец крови объемом 5 см<sup>3</sup> разбавляли в 20 раз ацетонитрилом (доводили объем пробы до 100 см<sup>3</sup>), гемолизованные эритроциты и значительную часть скоагулированных белков отделяли от раствора центрифугированием при 8000 об/мин в течение 4 минут. Полученный центрифугат пропускали через стандартный патрон для ТФЭ объемом 1 мл.

Анализ элюата с патрона показал, что в крови присутствуют все 4 бетаина в сравнимых концентрациях, которые достаточно надежно регистрировались детектором хроматографа. Лекарственный препарат может определяться с еще большей надежностью, поскольку его терапевтическая концентрация в крови обычно значительно превышает таковую для нативных бетаинов. Отсутствие же посторонних пиков в области выхода бетаинов подтвердило тот факт, что очистка пробы методом ТФЭ оказалась вполне эффективной (рис. 2).

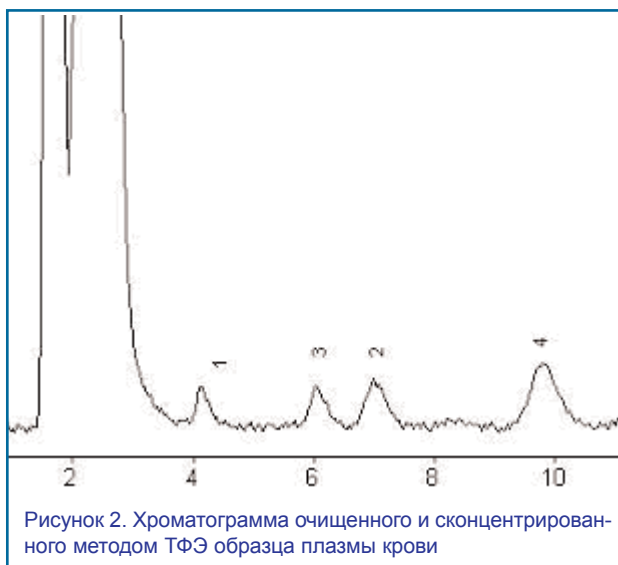


Рисунок 2. Хроматограмма очищенного и сконцентрированного методом ТФЭ образца плазмы крови

Несмотря на то, что поставленная цель прямого анализа бетаинов в крови была достигнута, методика оставалась достаточно громоздкой и трудоемкой. И хотя была достигнута приемлемая экспрессность анализа (30-40мин), для большинства практических целей желательно было бы еще сократить время анализа и уменьшить объем крови, необходимой для проведения манипуляций по осуществлению методики.

Это стало возможным исключительно благодаря разработанным в 80-х годах прошлого века методом синтеза гетероповерхностных (дифильных) сорбентов. Такие сорбенты специально предназначены для ВЭЖХ анализа биологических проб. Высокомолекулярные соединения,

Таблица 3. Зависимость коэффициента удерживания бетаинов от pH (подвижная фаза: 70% ацетонитрила - 0,02 М фосфатный буфер)

Соединение	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Глицин-бетаин	0.95	2.15	3.16	3.23	3.50	3.71	3.99
б-Аланин-бетаин	2.17	4.31	6.21	6.33	6.96	7.85	8.15
г-Треонин-бетаин	2.02	3.98	5.82	5.95	6.12	7.01	7.08
Бетаин г-аминомасляной к-ты	3.85	5.35	8.51	9.06	9.23	9.82	10.2

составляющие большую проблему при использовании обычных сорбентов на основе силикагеля, на дифильных сорбентах не удерживаются и выходят в мертвом объеме. Таким образом, они не мешают анализу низкомолекулярных веществ, которые могут проникать в более мелкие поры сорбента и разделяться там в соответствии с сорбционными свойствами поверхности пор.

Тем не менее, до сих пор дифильные сорбенты использовались с химически модифицированными (чаще всего алкильными цепями) поверхностью основных пор. Попыток оставить в мелких порах немодифицированный силикагель при "противобелковой" химической пришивке на крупные поры пока никто еще не предпринимал.

И априори сложно было предположить, как будет работать столь необычный режим как ДИРФ в условиях дифильных сорбентов и какие методические приемы синтеза сорбентов такого рода окажутся пригодными в этом случае.

Для проведения дальнейших работ на биологических объектах были изготовлены колонки с оригинальными сорбентами, предназначенными для прямого ввода биологических жидкостей, содержащих значительное количество белков и полипептидов. Одна хроматографическая колонка 2x120 мм, была заполнена сорбентом Si-600 Bg - трис[CH<sub>3</sub>CN], а другая такая же колонка - сорбентом Si-600 Bg - [2 окт] альбумин.

Экспериментальная проверка хроматографических свойств вновь полученных сорбентов на модельных растворах и сравнение их с аналогичными параметрами, полученными на колонке, заполненной обычным силикагелем показала, что на колонке с сорбентом, модифицированным ТРИСом разделение протекает недопустимо плохо. Явно проявляется существенное изменение поведения исследуемых сорбатов, по сравнению с немодифицированным силикагелем, пики уширены и асимметричны, а удержание сорбатов заметно упало. Это, видимо, связано с тем, что относительно небольшие молекулы ТРИСа существенно модифицировали поверхность силикагеля и в основных порах. Таким образом, этот сорбент был признан непригодным для реализации данной методики.

Результаты экспериментов, полученных на колонке с силикагелем, модифицированным альбумином, напротив, оказались несравненно лучше. Эффективность, селективность и прочие значимые характеристики сорбента были практически идентичны аналогичным параметрам, характерным для немодифицированного силикагеля. Ход анализа при использовании гетероповерхностного сорбента претерпел существенные изменения. В образец крови, объемом 0,5 мл добавляли 50 мкл трихлоруксусной кислоты, после чего полученный раствор фильтровали под давлением в виалу через мембранный фильтр с порами, размером 0,2 мкм. Примерно 200 мкл фильтрата упаривали в виале до четверти первоначального объема под вакуумом. В хроматограф дозировали 15-20 мкл полученного раствора.

Вид хроматограммы приведен на рис. 3. Следует отметить, что в информативной области хроматограммы начинают проявляться посторонние компоненты, которые, тем не менее, не перекрываются с целевыми веществами.

Использование специальных сорбентов позволило значительно сократить время анализа и максимально сократить операции по подготовке пробы.

Кроме того, видится, что использование специальных технических приемов и оборудования для манипуляции с малыми объемами жидкостей позволит снизить объем необходимой для анализа крови до 200 - 300 мкл.

Первоначально проводили разделение бетаинов на хроматографе фирмы "Gilson" оснащенном УФ-детектором модель 115, насосом плунжерного типа модель 320, монотриггерным модулем модель 805, инжектором петлевого типа Rheodyne модель 7120 с петлей, объемом 20 мкл, с колонкой 4x250 мм, заполненной гетероповерхностным сорбентом.

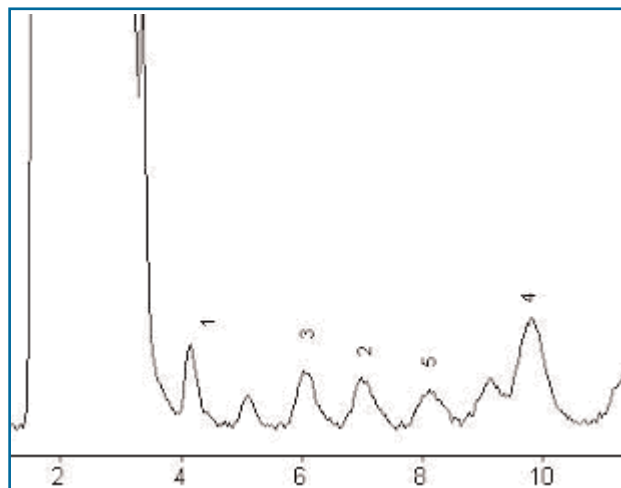


Рисунок 3. Хроматограмма образца плазмы крови на колонке с гетероповерхностным сорбентом

Результаты экспериментов показали несколько более высокую чувствительность по сравнению с микроколоночным вариантом (Милихром), обусловленную, очевидно, гораздо большей эффективностью разделения, но неожиданно выявили одну неочевидную особенность. При дозировании пробы краном-дозатором Reodyne 7120 последующие холостые дозировки элюента приводили к появлению на хроматограмме размытых пиков, интенсивность которых уменьшалась при последующих холостых дозировках. Видимо, это связано с тем, что макрокомпоненты пробы при первом вводе частично сорбировались на полиимидном уплотнении дозатора, а затем, при холостом вводе, вымывались элюентом в колонку. Таким образом, использование хроматографа "Милихром" является более предпочтительным для реализации данной методики, поскольку не требует каких-либо технических приемов по организации непрерывной промывки петли крана-дозатора, явно необходимой для хроматографов с традиционной схемой ввода пробы.

Следует отметить еще одну особенность режима ДИРФ - аномально высокую зависимость удерживания сорбатов от содержания ацетонитрила в элюенте. Уменьшение концентрации ацетонитрила всего на несколько процентов может значительно снизить удержание сорбатов в колонке. Поэтому при работе, например, на Милихроме, нужно периодически менять элюент в виалах на свежий, поскольку конструкция этого хроматографа такова, что элюент находится в зоне тепловых потоков от дейтериевой лампы и со временем может потерять часть летучего компонента за счет испарения.

Дальнейшие эксперименты по оптимизации состава элюента позволили ощутимо повысить эффективность разделения анализируемых веществ при замене до 5% ацетонитрила на метанол. Вероятно, причиной такого воздействия метанола является уменьшение толщины пленки НЖФ, образующейся при разделение фаз. Интересно, что такая добавка совершенно не влияет на селективность разделения, но сильно уменьшает емкость сорбента по отношению к разделяемым веществам, что сказывается на качестве разделения и форме пиков при хроматографировании относительно концентрированных модельных растворов бетаинов.

Метрологические характеристики разработанного метода приведены в таблице 4. Учитывая, что стандартные образцы с аттестованными значениями определяемых веществ отсутствуют и для определения метрологических характеристик использовались модельные смеси, процент ошибки при воспроизведении может быть несколько выше, из-за влияния сложной матрицы.

Таблица 4. Метрологические характеристики методики

Соединение	Границы интервала, в котором погрешность находится с доверительной вероятностью $P=0,95$ , %	Предел повторяемости $r$ , %	Предел воспроизводимости $R$ , %
Глицин-бетаин	6	6	10
б-Аланин-бетаин	8	8	12
г-Треонин-бетаин	6	6	10
Бетаин г-аминомасляной к-ты	11	11	16
Милдронат	10	10	14

## Литература

- Сердан А.А., Богословский С.Ю., Нестеренко Н.П. Зависимость удерживания некоторых лекарственных препаратов на дифильных сорбентах от pH и ионной силы элюента// В тез. докл. V всесоюзн. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии, Юрмала, 20-22 ноября 1990 г. С.140.
- Лапин Б.П. Подготовка образцов к хроматографическому анализу: методы твердофазного экстрагирования и экстрагирования при сверхкритических условиях. Автоматическое экстрагирование в системе, объединенной с жидкостным хроматографом// В тез. докл. всесоюзн. конф. "Применение хроматографии в пищевой, микробиологической и медицинской промышленности". Геленджик, 8-12 октября 1990. С.95-96.
- Maeda J., Yamakava M., Mimura J., Furuga K., Oohara T., Dudrick S.J., Nippon J. Specific determination of plasma carnitine concentration and reference study// Keicho Eigo Kenkyukaishi. 1989. N4. P.316-318.
- Kodo N., Millington D.S., Norwood D.L., Roe Ch.R. Quantitative assay of free and total carnitine using tandem mass-spectrometry and liquid chromatography// Clin. Chem. Acta. 1990. Vol.186. N3. 383-90.
- Martin J.J., Finkelstein J.D. Enzymatic determination of betaine in rat tissues. Anal.Biochem. 1981. Vol.111. P.72-76.

## А.В. Удалов. Рецензия на статью Л.В. Сапрыкина и соавторов "Прямой анализ бетаинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ"

В статье предложено нетривиальное решение трудной аналитической задачи - определения следовых количеств гидрофильных веществ в водосодержащей матрице сложного состава. Эта задача сложна на всех этапах ее решения. Необходимо концентрирование аналита, так как он находится в объектах в крайне низкой концентрации. Его гидрофильность в широком диапазоне pH исключает применение традиционных методов экстракции органическими растворителями при контролируемой кислотности и делает затруднительным хроматографическое отделение от сопутствующих веществ. Слабое поглощение в УФ-области и отсутствие характерных спектров не позволяют осуществить селективное детектирование на наиболее распространенном типе детектора - спектрофотометрическом. Тем не менее, авторам удалось оптимизировать условия пробоподготовки, хроматографического разделения и количественного определения и изящно решить поставленную задачу.

Работа не только показывает пример красивого решения сложной задачи и дает направление поиска для разработки методик анализа биожидкостей на содержание гидрофильных веществ, например, таких как дитилин, прозерин и другие четвертичные аммониевые основания, быстрое и достоверное определение которых, является одной из нерешенных проблем в токсикологическом и судебно-химическом анализе.

По тексту статьи можно отметить только несколько

незначительных замечаний. Поскольку описанные эксперименты выполнены достаточно давно, но подробно не публиковались в силу определенных организационных причин, некоторые моменты потеряли былую актуальность. Авторы указывают на неустойчивость силикагеля при pH выше 7, тогда как уже выпускаются сорбенты на основе сферического силикагеля, позволяющие работать при pH 10. Проблемы испарения ацетонитрила из элюента, связанные с конструктивными особенностями ряда моделей хроматографов "Милихром" устранены в более современных приборах. В статье не приведены константы ионизации аналитов, поэтому сложно оценить с чем связано повышение удерживания при росте pH, с образованием цвиттер-ионов, как считают авторы, либо с иными факторами, зависящими от ионизации по четвертичному азоту и карбоксильной группе.

## М.И. Евгеньев. Рецензия на статью Л.В. Сапрыкина, А.А. Сердана, Л.В. Сапрыкиной "Прямой анализ бетаинов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ"

Рецензируемая работа посвящена разработке методов анализа биологически активных веществ-бетаинов в биологических жидкостях различными вариантами ВЭЖХ. Актуальность такой постановки исследования не вызывает сомнений, поскольку бетаины используются в качестве действенных лекарственных препаратов. Знание состава и количества этих веществ позволяет также проводить диагностику многих заболеваний.

Для ВЭЖХ определения потребовалось изучение: Влияния pH на коэффициенты удерживания веществ; Влияние содержания ацетонитрила в элюенте на коэффициенты удерживания веществ; Эффективность твердофазного концентрирования веществ на концентрирующих патронах; Использование специальных гетероповерхностных сорбентов.

К статье не имеется замечаний существенного характера и ее можно рекомендовать для публикации в журнале "ХА".

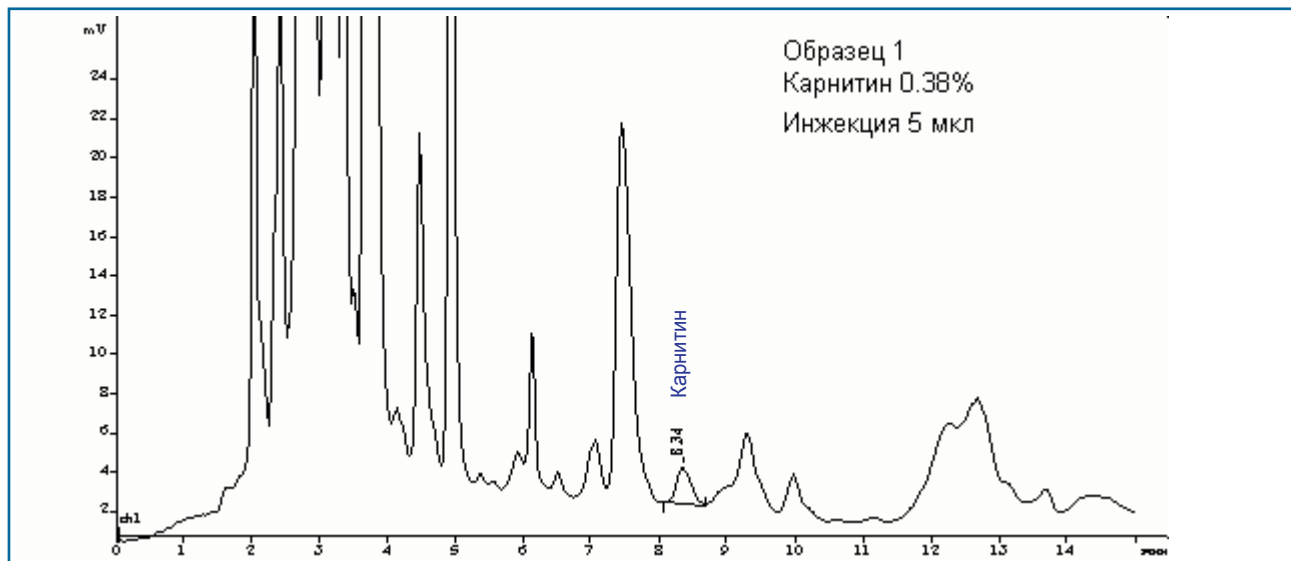
Единственное пожелание - более подробно изложить результаты процессов твердофазной экстракции.

Д.х.н., профессор Казанского государственного технологического университета М.И. Евгеньев

## Комментарии редактора

Сначала хотелось бы отметить, что бетаины вполне можно анализировать в режиме ион-парной обращенно-фазовой хроматографии (было дело - занимался этим вопросом). Просто это неудобно. У пиков бетаинов действительная высокая асимметрия, но ее можно убрать, чрезвычайно сильно закислив элюент (до pH 2.0), а, главное, пробу - до pH 0.0, - в этом и заключается основная "хитрость".

На рисунке приведен пример определения карнитина в образце батончика "Mars", обращенная фаза 250x4.6 Inertsil ODS, 40% ацетонитрила в 5мМ водном



растворе додецилсульфоната натрия, pH 2.0 фосфорной кислотой, детектирование УФ 210 нм.

Но пример этом, вообще, "несерьезный". Разделение получается очень неселективным. Любая примесь, вставшая на место карнитина, сразу сделает определение невозможным. А в этом диапазоне как раз "группируются" все аминокислоты (скорее всего, именно они окружают пик карнитина). Просто в данном случае мне повезло с объектом.

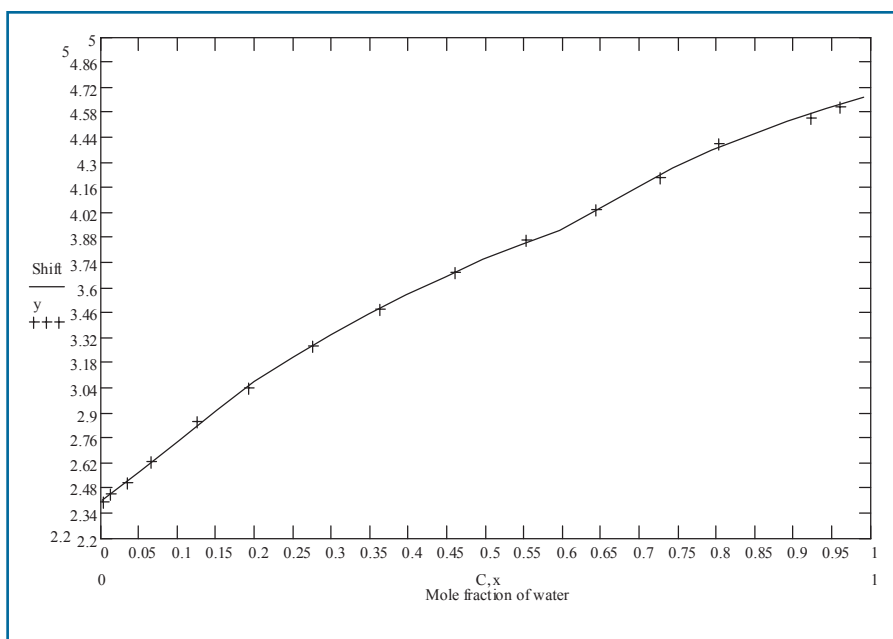
Гидрофильная хроматография, по-моему, вещь гораздо более селективная. Это не всегда хорошо, но в данном случае это именно то, что надо.

Кстати, вот пример задачи, где очень желательна система с переключением колонок. Только с применением двухколоночной схемы эта задача может быть решена действительно надежно.

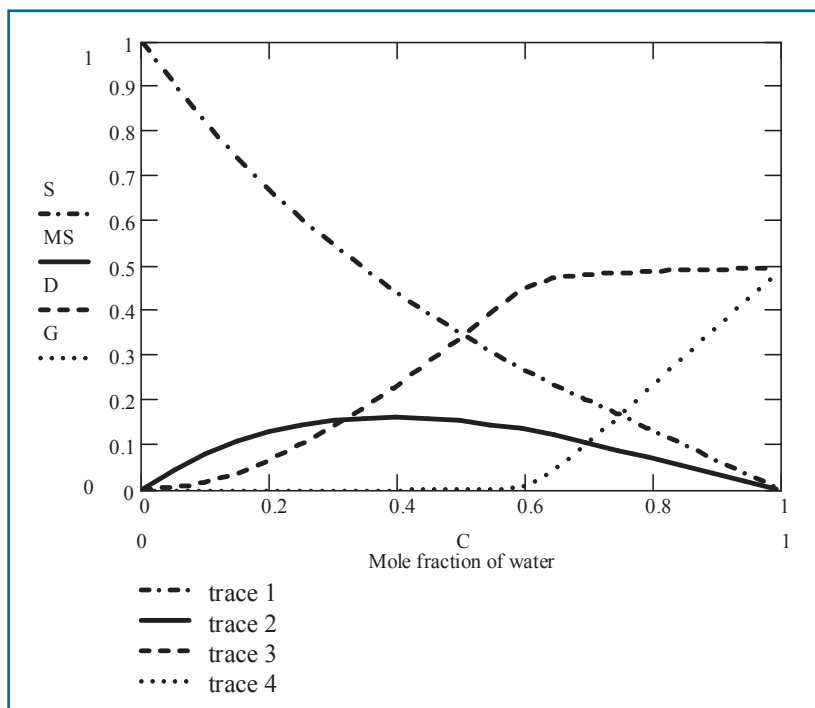
Еще хотелось бы отметить ряд очень интересных экспериментальных зависимостей, снятых, видимо, "между делом". Особенно интересна, по-моему, зависимость удерживания одного из анализов от концентрации ацетонитрила. Такие данные позволяют открыть исследователю глаза на процессы, происходящие в водных средах и на границах раздела водной среды и полярной твердой фазы.

Дело в том, что я занимался вопросами изучения строения водно-органических систем на основе ЯМР спектроскопии. Заметив, что "перелом" в удерживании наступает в точке, когда ацетонитрила и воды приблизительно одинаковое количество, я вспомнил свои данные по водно-диоксановым системам (диоксан и ацетонитрил в смесях с водой ведут себя подобно, в отличие от спиртов). Дело в том, что при 55-60% мольных воды из ассоциатов "вода-растворитель" начинают собираться достаточно крупные глобулы воды (или разрушаться - смотря с какой стороны посмотреть). Именно в этой точке начинается активный протонный обмен между молекулами воды.

Подтверждают косвенно вывод об образовании водных глобул и следствия модели водно-диоксановых систем, которая основана на наблюдении зависимости протонного химического сдвига HDO от концентрации диоксана (в точке "фазового перехода" на графике этой зависимости появляется излом). Не вдаваясь в подробности, приведу результирующие графики.



Вид расчетной зависимости химического сдвига HDO (ось y) от мольной доли диоксана (ось x). Точки - экспериментальные данные, кривая получена в соответствии с расчетом по предложенной модели



Зависимости мольной доли растворителя (trace1), ассоциата вода-растворитель (trace2), воды в форме димера (trace 3) и воды в форме глобул (trace 4) относительно общей мольной доли воды

Таким образом, можно предположить, что резкое уменьшение удерживания бетаина при 40-50% объемных ацетонитрила связано с тем, что в этом диапазоне в подвижной фазе начинают формироваться водные глобулы, характеризующиеся большей элюирующей силой, чем гомогенная водно-ацетонитрильная фаза.