

ИОН-ПАРНАЯ ВЭЖХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА И ПУРИНА

Моисеев Д.В.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Производные пиримидиновых и пуриновых оснований находят широкое применение в медицинской практике. Эти соединения кодируют наследственную информацию в ДНК и РНК, обладают противовирусной и противоопухолевой активностью. Контроль качества лекарственных средств, содержащих производные пуриновых и пиримидиновых оснований, проводится, в основном, методом ВЭЖХ. В обращенно-фазовом (ОФ) варианте ВЭЖХ удерживание определяется сродством молекул хроматографируемых соединений с поверхностью сорбента. Качественно новые свойства хроматографические системы могут приобретать при введении в подвижную фазу (ПФ) динамического модификатора. Этим термином обозначается соединение, поступающее в колонку в составе ПФ и находящееся в динамическом равновесии с другими компонентами системы, радикальным образом изменяющее механизм сорбции и вызывающее качественные изменения селективности системы. Суть метода ион-парной ВЭЖХ заключается в динамическом модифицировании поверхности ОФ сорбента (например, октадецилсиликагеля) группами, обладающими ионообменными свойствами. Для этих целей используются гидрофобные органические соединения с ионогенными группами. Для разделения оснований используются алкилсульфаты натрия, для разделения кислот – соли тетраалкиламмония. Величина и направление модифицирующего эффекта связаны с гидрофобностью и знаком заряда ион-парного модификатора. Если сорбат и модификатор имеют одинаковые заряды, введение последнего уменьшает удержание. При разноименных зарядах удерживание увеличивается. Введение ион-парных агентов обычно немного уменьшает коэффициенты емкости даже нейтральных сорбатов. Целью настоящего исследования являлось изучение общих закономерностей сорбции пуриновых и пиримидиновых оснований при ион-парном варианте обращенно-фазового хроматографирования с динамическим модифицированием нагреваемыми солями алкилсульфонокислот (C_6 , C_7 , C_8 , и C_{12}). Объектами исследования служили вещества производные пурина и пиримидина: кофеин, теобромин, теofilлин, трентал, ксантинола никотинат, аденин, аденозин, АТФ, ацикловир, гуанин, гуанозин, аллопуринол, рибоксин, цитидин, цито-

зин, ЦМФ, цЦМФ, циклоцитидин. Из перечисленных веществ готовились 0,05% водные растворы и непосредственно перед инъектированием разбавлялись в 10 раз ПФ (0,05 М фосфатный буфер, 0,005 М алкилсульфат натрия рН=2,5 и ацетонитрил 90:10). Значение рН ПФ подбиралось нами исходя из того, что при рН=2,5 большинство соединений существуют в ионизированном состоянии в форме катионов.

Исследования выполнялись на микроколоночном жидкостном хроматографе «Миляхром-4» (Россия), снабженным спектрофотометрическим детектором (УФ-область). Регистрация осуществлялась при длине волны 260 нм. Для исследований использовалась колонка из нержавеющей стали (80×2 мм), заполненная сорбентом Nucleosil 100 С-18, 5 мкм. Скорость подачи ПФ 0,1 мл/мин, объем инъектируемых проб 5 мкл. Коэффициент емкости рассчитывали по формуле: $k' = (V_r - V_0)/V_0$, где V_0 – удерживаемый объем несорбируемого компонента (120 мкл – определяли по объему несорбируемого компонента NaNO_2) V_r – удерживаемый объем сорбируемого компонента.

Таблица 1

Коэффициенты удерживания производных пиримидина и пурина в ПФ с различными ион-парными реагентами

| | Без ИПР | C_6 | C_7 | C_8 | C_{12} |
|----------------------|---------|-------|-------|-------|----------|
| Цитозин | 0,48 | 0,62 | 0,83 | 1,24 | 9,38 |
| Цитидин | 0,50 | 0,63 | 0,84 | 1,24 | 5,79 |
| Циклоцитидин | 0,53 | 0,69 | 0,89 | 1,26 | 6,30 |
| ЦМФ | 0,40 | 0,39 | 0,39 | 0,38 | 0,46 |
| цЦМФ | 0,44 | 0,41 | 0,41 | 0,43 | 0,65 |
| Аденин | 0,63 | 0,82 | 1,12 | 1,74 | 11,48 |
| Аденозин | 0,68 | 0,85 | 1,07 | 1,50 | 5,45 |
| АТФ | 0,37 | 0,32 | 0,27 | 0,24 | 0,17 |
| Аллопуринол | 0,79 | 0,83 | 0,82 | 0,80 | 0,60 |
| Ацикловир | 0,75 | 0,80 | 0,87 | 0,98 | 2,27 |
| Гуанин | 0,61 | 0,71 | 0,89 | 1,37 | 3,98 |
| Гуанозин | 0,73 | 0,73 | 0,79 | 0,89 | 1,66 |
| Кофеин | 5,47 | 5,14 | 4,83 | 4,39 | 2,77 |
| Ксантинола никотинат | 1,95 | 2,65 | 3,79 | 5,22 | 20,19 |
| Рибоксин | 0,70 | 0,66 | 0,66 | 0,63 | 0,51 |
| Теобромин | 1,83 | 1,79 | 1,66 | 1,61 | 0,98 |
| Геофиллин | 1,84 | 1,80 | 1,66 | 1,62 | 0,99 |
| Грентал | 26,01 | 24,69 | 22,56 | 18,17 | 8,30 |

Анализ полученных экспериментальных данных по удерживанию производных пиримидина и пурина показал подчинение уравнению: $\lg k' = d + c \cdot \lg n$ (1), где k' – коэффициент емкости сорбента, n – число атомов углерода в динамическом модификаторе (коэффициент

корреляции уравнения 1 более 0,95). Гидрофобные производные пуриновых оснований – метилксантины (кофеин, теобромин, теофиллин, трентал), а также аллопуринол, рибоксин при значении $pH=2,5$ сорбируются по типу нейтральных соединений. АТФ, ЦМФ, цЦМФ и ксантинола никотинат существуют в виде цвиттер-ионов, причем у АТФ преобладает механизм сорбции по типу слабой кислоты, а ЦМФ, цЦМФ и ксантинола никотинат сорбируются по типу оснований. Все остальные соединения сорбируются по типу оснований.

Проведенные исследования позволили изучить основные закономерности сорбции в ион-парной ОФ ВЭЖХ соединений производных пиримидина и пурина, с использованием в качестве динамических модификаторов алкилсульфатов.