

УДК 543.545.1

С.В. АНТОНОВА¹, Н.Г. ДЕМИНА¹, К.В. ЛОБАНОВ¹, Т.А. КУВАЕВ¹, А.С. МИРОНОВ¹, А.А. ПУШКОВ¹,
Н.Ф. РУМЯНЦЕВА¹, Б.В. ТЯГЛОВ^{1,*}, Р.С. ШАКУЛОВ¹, И.И. МАЛАХОВА², В.Д. КРАСИКОВ²

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

² НТЦ «Ленхром», Санкт Петербург, 199004

e-mail: b_tyaglov@genetika.ru

Применение тонкослойной хроматографии на силикагеле для анализа природных нуклеозидов и их производных

В обзоре обобщены опубликованные за последние годы данные по разделению и количественному определению природных нуклеозидов и ряда их производных путем тонкослойной хроматографии на силикагеле. Обсуждается использование с этой целью более 20 различных подвижных фаз для разделения 52 нуклеозидов и их производных; в ряде случаев приведены условия количественного определения аналитов после ТСХ методом денситометрии. Подробно описаны работы, выполненные в ГосНИИгенетика и связанные с анализом инозина, тимидина и акадесина в КЖ соответствующих штаммов-продуцентов на отечественных пластинках Сорбфил.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, денситометрия, нуклеозиды, тонкослойная хроматография.

История и современное состояние проблемы

Нуклеозиды являются низкомолекулярными компонентами нуклеиновых кислот (НК). Они образуются *in vivo* при воздействии на НК специфических ферментов, кислот или щелочей.

Нуклеозиды представляют собой N-гликозиды, содержащие в качестве углеводной части D-рибозу или 2'-дезоксид-рибозу; их называют

соответственно рибонуклеозидами или дезоксирибонуклеозидами. Полимерные цепи ДНК и РНК построены из монофосфорных эфиров нуклеозидов — нуклеотидов [1]. В зависимости от положения остатка фосфорной кислоты в пентозном цикле нуклеотиды подразделяются на 2',3'- или 5'-фосфаты для рибозного (рибо-) ряда и 3'- или 5'-фосфаты для дезоксирибозного (2'-дезоксирибо-) ряда.

Антонова Светлана Владимировна, Демина Наталья Георгиевна, Лобанов Константин Владимирович, Куваев Тимофей Андреевич, Миронов Александр Сергеевич, Пушков Александр Алексеевич, Румянцова Надежда Фридриховна, Тяглов Борис Владимирович, Шакулов Рустем Саидович, Малахова Ирина Ивановна, Красиков Валерий Дмитриевич.

Список сокращений: ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; НК — нуклеиновые кислоты; ПКО — предел количественного определения; ТСХ — тонкослойная хроматография; УФ — ультрафиолетовый; ФС — фармакопейная статья; А — аденин; АМР — аденозин-5'-монофосфат; АМРК — АМР-активируемая протеинкиназа; С — цитозин; гА — аденозин; гС — цитидин; RSD — относительное стандартное отклонение; гТ — тимидин; гУ — уридин; S/N — соотношение сигнал/шум; Т — тимин; У — урацил.

* Автор для переписки.

В настоящее время нуклеозиды широко используются как антибиотики, иммуномодуляторы и препараты, обладающие противовирусной или противоопухолевой активностью [2].

Тонкослойная хроматография (ТСХ) для анализа нуклеозидов используется с середины 50-х годов прошлого века. Основными сорбентами для ТСХ служили целлюлоза, DAEF-целлюлоза, ECTEOA-целлюлоза, P-целлюлоза, CM-целлюлоза, MN-300-целлюлоза, PEI-целлюлоза, силикагель и силикагель с привитыми фазами, такими как C_8 -, C_{18} -, циано- или диол- [3].

Необходимо отметить, что традиционно ТСХ используется для анализа органических соединений, в том числе лекарственных препаратов, и включена в фармакологические статьи как метод для идентификации (подтверждения подлинности) лекарств в большинстве фармакопей мира. Однако в них процесс ТСХ обычно трактуется широко, что оставляет много возможностей для субъективного подхода. Результаты различных исследований значительно разнятся и трудно сопоставимы. Воспроизводимость рутинной процедуры ТСХ не всегда высока из-за влияния различных факторов, которые часто не принимаются во внимание [4]. Модернизация методологии нередко вызывает значительное сопротивление. Таким образом формируется тенденция рассматривать ТСХ как устаревший метод, который должен быть заменен на более надежную ВЭЖХ или др.

Несмотря на это ТСХ не следует недооценивать. Например, возможность давать “снимок” профиля нуклеозидов [5] важна не только для их идентификации, но также и для проверки на стабильность, и при контроле качества препаратов на производстве. Быстрота и низкая стоимость ТСХ также весьма существенны для промышленных процессов. Принципиальным требованием для использования ТСХ как современного метода анализа является последовательное совершенствование методологии с учетом полезных новшеств, описываемых в публикуемых работах.

Согласно литературным данным, доля работ с использованием ТСХ на основе пластин силикагеля (с или без привитых фаз) в период с середины 70-х годов по настоящее время составила 7,3% от общего количества публикаций, посвященных применению ТСХ для анализа нуклеозидов [6, 7]. Основное количество работ в этой области было опубликовано в 70—80-е годы 20-го века

[3, 7]. Большинство исследований, рассмотренных в настоящем обзоре, было выполнено на ТСХ-пластинах, выпущенных фирмой Merck (Германия) [8], поэтому далее в тексте при анализе ТСХ с помощью этих пластин изготовитель указываться не будет. Необходимо отметить, что пластинки для ТСХ на основе силикагеля с привитыми фазами, а также на основе целлюлозы и ее модифицированных форм, пригодные для денситометрических измерений, в России до настоящего времени не производятся.

С 1989 г. на предприятии IMID Ltd (Краснодар) налажен массовый выпуск пластин для ТСХ “Сорбфил” по технологии, разработанной в 1985 г. в НТЦ “Ленхром” (Санкт-Петербург) [9]. Эти пластины выпускаются на различных подложках, таких как полиэтилентерефталат, алюминий или стекло. ТСХ-пластины Сорбфил помимо возможности многократного использования обладают высокой эффективностью и характеризуются равномерным слоем сорбента, что позволяет проводить денситометрические измерения. Толщина слоя силикагеля составляет $(0,1 \pm 0,005)$ мм, средний диаметр частиц равен 8—12 мкм (высокоэффективные пластинки) или 8—17 мкм (аналитические пластинки), а связующим материалом является силиказоль [4]. Для детекции соединений, поглощающих в УФ области спектра, в сорбционный слой добавляют флуоресцентные индикаторы, такие как смесь силикатов цинка и кадмия [4].

Целью настоящего обзора являлось обобщение данных о методах разделения и количественного определения природных нуклеозидов на слоях силикагеля, которые опубликованы за период с середины 70-х годов 20-го века по настоящее время.

Использование ТСХ для разделения нуклеозид-содержащих смесей

Разделение *аденозина*, *2'-дезоксирибоаденозина*, *гипоксантина*, *ксантина* и *инозина* было проведено Пфеффером и сотр. на ТСХ-пластинках с силикагелем в системе вода—метанол— 25%-ный водный аммиак—хлороформ (2:9:1:9, об.)*; величины R_f этих соединений составляли 0,58; 0,45; 0,50 и 0,39, соответственно [10].

Морден и сотр. анализировали смесь, состоящую из *аденина (A)*, *аденозина (rA)*, *урацила (U)*, *уридина (rU)*, *цитидина (rC)*, *цитозина (C)*, а

* Здесь и далее приведены объемные отношения растворителей, входящих в подвижную фазу.

Величины Rf нуклеиновых оснований и нуклеозидов в различных подвижных фазах

Соотношение метанол—хлороформ—25%-й водный аммиак	rU	U	rA	A	rC	C	T	rT
0:100:0	0	0	0	0	0	0	0	0
10:90:1	0	0,10	0,05	0	0	0	0,12	0,06
15:85:1	0,08	0,35	0,28	0,20	0,05	0,08	0,50	0,35
20:80:1	0,19	0,53	0,44	0,32	0,05	0,16	0,67	0,52
30:70:1	0,23	0,56	0,53	0,46	0,1	0,23	0,69	0,65
40:60:1	0,63	0,81	0,66	0,66	0,25	0,40	0,91	0,91

также тимина (T) и тимидина (rT), с помощью ряда подвижных фаз, содержащих метанол, хлороформ и 25%-ный водный аммиак, варьируя при этом количество двух первых компонентов от 0 до 40% и от 0 до 100%, соответственно [11]. Количественное определение разделенных компонентов проводили с помощью масс-спектрометрии. Результаты разделения представлены в табл. 1.

В табл. 2 обобщены данные по разделению 36 нуклеозидов (из примерно 60 нуклеозидов, сепарация которых описана в литературе) и их производных на тонких слоях силикагеля в 17 подвижных фазах. Однако характерно, что практически ни для одного варианта не показана погрешность измерения Rf и не указано количество проведенных независимых экспериментов.

Ранее при разработке условий разделения и количественного определения различных **свободных незаменимых аминокислот** было установлено, что погрешность измерения величины Rf этих соединений на хроматограммах варьирует от 0,15 до 0,25, при $n=3$ и $P 0,95$ [33], что свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов.

Известно, что УФ облучение растворов ДНК приводит к образованию **“тимидинов-димеров”**, сшивающих две цепи двойной спирали, что приводит к мутации [1]. Динамика димеризации тимидина при облучении последнего УФ светом была изучена с использованием системы растворителей этилацетат—пропанол-2—вода—25%-ный водный аммиак (3:5:1:0,5). Тимидин и тимидиновый димер успешно разделялись при Rf $0,45 \pm 0,03$ и $0,52 \pm 0,03$, соответственно [34].

А.О. Балушкин и В.Г. Березкин с помощью электроосмотической ТСХ на отечественных пластинках Сорбфил (лавсановая подложка, аналитический вариант) осуществили разделение следующих смесей (в скобках указана скорость перемещения хроматографических зон сорбатов, мм/с): **аденин (0,6), аденозин (1,3) и аденозин-5'-монофосфат (0,1); гипоксантин (0,8), инозин (1,2) и инозин-5'-монофосфат (0,21); тимидин (0,6), 3'-дезоксигуанидин (1,3) и тимидин-5'-монофосфат (0,1), а также урацил (0,4), уридин (0,8), 5-бромурин (1,2) и уридин-5'-монофосфат (0,1)**. Разделение проводили при напряжении 5 кВ, величине тока 50 мкА и напряженности поля 50 В/см на установке, сконструированной и смонтированной в ИНХС РАН, в подвижной фазе диметилсульфоксид—5%-ный водный аммиак (75:25 или 70:30). Время разделения составило 5 мин. Количественную обработку хроматограмм проводили на видеоденситометре “Сорбфил” (Россия). Для производных тимидина было проведено сравнение денситометрических данных, полученных с помощью электроосмотической ТСХ и классической ТСХ с использованием подвижной фазы хлороформ—метанол—вода (15:10:3); при этом была обнаружена хорошая корреляция полученных обоими методами результатов ($r=0,98943$) [35].

Нуклеозид инозин является субстанцией для лекарственного препарата “Рибоксин” (торговое название, ФС-42-2096-83), который применяется при комплексной терапии ишемической болезни сердца, нарушении ритмов сердца, после перенесенного инфаркта. Рибоксин также назначают при заболеваниях печени, таких как гепатит В

Rf нуклеозидов и их производных при ТСХ с использованием различных подвижных фаз и пластинок на основе силикагеля [12—32]

Соединение	Подвижная фаза																
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Адеминозин	0,45	0,00		0,35		0,75	0,54										
Адемнин	0,59																
5'- <i>o</i> -Триладенозин	0,75									0,90		0,54					
2',3'- <i>n</i> -Анизидадемозин	0,75								0,61								
2',3'-Этоксиметиленаденозин	0,69								0,54								
5'- <i>o</i> -Метилладенозин				0,42		0,60											0,43
5'- <i>o</i> -Этиладенозин				0,49		0,68											0,48
5'- <i>o</i> -Пропилладенозин				0,58		0,72											0,54
5'- <i>o</i> -Бутиладенозин				0,61		0,78											0,59
3'- <i>o</i> -Формил-(N-ацетил)-2'-дезоксиаденозин					0,82												
2'-Дезоксиаденозин							0,49										
N-Метилладенозин																	0,44
N-Пропилладенозин																	0,50
N- <i>i</i> -Пропилладенозин																	0,50
2'-Дезоксигуанозин								0,40				0,41					
5'- <i>n</i> -Нитрофенил-дезоксигуанозин								0,74									
5'- <i>o</i> -Тритилгуанозин									0,46	0,74							
2'-Дезоксиуридин								0,27									
Уридин											0,40	0,45	0,42				
5'-Метилуридин											0,52						0,44
5'-Фторуридин											0,35						
5'-Хлоруридин											0,32						
5'-Бромуридин											0,29						
5'-Иодуридин											0,27						
5'- <i>o</i> -Метилуридин													0,48				
5'- <i>o</i> -Этилуридин													0,54				
5'- <i>o</i> -Изопропилуридин													0,58				

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Цитидин			0,39			0,52											
5'-Метилцитидин			0,45														
2'-Дезоксицитидин								0,31								0,40	
5'-о-Тритил-2'-дезоксидитидин										0,42							
5'-о-Тритилтимидин									0,42	0,55							
Тимидин														0,54	0,50		
5'-о-Ацетилтимидин														0,68			
3'-Дезокси-3'-азидотимидин														0,48			
3'-Дезокси-3'-азидо-5'-о-ацетилтимидин														0,59			

Примечание: подвижные фазы:

I — бутанол-1—пропанол-2—25%-ный водный аммиак—вода (2:8:1:1), денситометрия, $\lambda = 260$ нм, ПКО = 0,12 мкг/л, RSD < 1,0% [12, 13];

II — хлороформ—этилацетат—пропанол-2—вода (16:4:12:1) [14];

III — изомасляная кислота—вода—25%-ный водный аммиак, денситометрия [15];

IV — бутанол-1—ацетон—ледяная уксусная кислота—5%-ный водный аммиак (9:3:2:4), денситометрия, $\lambda = 260$ нм [16];

V — хлороформ—метанол (9:1) [17, 18];

VI — этанол—25%-ный водный аммиак (8:2) [19];

VII — пропанол-2—25%-ный водный аммиак—вода (7:2:1) [20, 21];

VIII — хлористый метилен—этилацетат (7:4) [22];

IX — хлористый метилен—метанол (9:1) [23];

X — хлороформ—вода—риэтиламин (90:5:5) [24];

XI — хлороформ—метанол—вода (5:5:1), денситометрия, $\lambda = 265$ нм [25];

XII — хлороформ—метанол—этилацетат—пропанол-2—25%-ный водный аммиак (8:3:3:3:0,9, v/v), денситометрия, $\lambda = 260$ нм [26, 27];

XIII — хлористый метилен—метанол—ледяная уксусная кислота (50:50:0,1, v/v), денситометрия, $\lambda = 260$ нм [28];

XIV — ацетон—вода (80:20, v/v), денситометрия, $\lambda = 270$ нм [29];

XV — пропанол-2—этилацетат—вода—25%-ный водный аммиак (6:3:2:1) [30, 31];

XVI — хлороформ—пиридин (9:1), ТСХ- пластинки Silufol фирмы Kavalier (Чехословакия) [32];

XVII — этилацетат—ацетон—метанол—25%-ный водный аммиак (2:3:3:2), ТСХ- пластинки Silufol, фирмы Kavalier [32].

и С и цирроз. Имеются данные об улучшении зрительных функций глаза у больных глаукомой при интенсивном приеме рибоксина [2]. Ранее инозин получали путем окислительного дезаминирования аденозина, выделенного из гидролизата РНК; при этом стоимость полученного продукта была крайне высокой [1]. В настоящее время промышленное производство инозина осуществляется микробиологическим методом, более выгодным с экономической и экологической точек зрения. При выполнении этой работы нас поразило практически полное отсутствие литературы по аналитическому обеспечению этого процесса. Так, хоро-

шо известный журнал “Analytical Chemistry” выпускает специальные обзорные номера, посвященные аналитической химии, в том числе и хроматографии в конкретных областях исследования (вода, пищевые продукты и т.д.), однако этот перечень не включает конечные и промежуточные продукты биотехнологических процессов. Журнал “Biotechnology. Bioscience and Bioengineering”, издаваемый в Японии, в разделе “Analytical Chemistry” практически не публикует статьи, связанные с определением антибиотиков, а основная масса публикаций по прикладной хроматографии посвящена биомедицинским исследованиям. Это касает-

ся, в частности, и журнала “Journal of Chromatography. Biomedical Applications”. В монографии “High Performance Liquid Chromatography in Biotechnology” антибиотикам, аминокислотам, витаминам и нуклеозидам, являющимися основными продуктами биотехнологических производств, уделено недостаточное внимание. Таким образом, возникает некий парадокс: аналитическое обеспечение бурно развивающейся и экономически эффективной отрасли промышленности — микробного синтеза антибиотиков, аминокислот, нуклеозидов и т.п. — не представлено на страницах аналитических журналов и монографий. Аналогичным образом практически отсутствуют литературные данные по аналитическому обеспечению процессов биосинтеза тимидина и акадесина (см. ниже). Возможно, все это обусловлено тем, что основная часть биотехнологических разработок выполняется в исследовательских центрах крупных фирм и применяемые при этом аналитические методы являются ноу-хау этих компаний.

Во ВНИИгенетика с середины 70-х годов прошлого века проводилась работа по селекции и увеличению производительности штамма-продуцента инозина. КЖ штамма — продуцента инозина содержит акадесин, гипоксантин, гуанин и гуанозин. Разделение этой смеси было выполнено на ТСХ-пластинках Силуфол UV-254 (Чехословакия) в следующих подвижных фазах: пропанол-2—25%-ный водный аммиак (6:1) и пропанол-2—вода—25%-ный водный аммиак (6:1:3). При использовании второй подвижной системы было выполнено бинарное элюирование при 20° в течение 60 мин и затем при 40° в течение 45 мин. Визуализацию пятен проводили с помощью ультрамикроскопа при $\lambda = 254$ нм, а количественное определение выполняли спектрофотометрически при $\lambda = 248$ нм после элюции соответствующих хроматографических зон. Погрешность метода составляла 3,0—4,0%, а продолжительность анализа 5,5—6,0 ч [36—38].

Как уже отмечалось во введении, в 1989 г. в России был налажен массовый выпуск отечественных ТСХ-пластинок Сорбфил [7]. В 1987—1988 г. было проведено испытание этих пластинок, при этом с помощью ТСХ было исследовано более 200 соединений различных классов, в том числе и продукты биосинтеза, присутствующие в КЖ штамма-продуцента инозина, такие как *гипоксантин*, *айкар* и *гуанозин*. Была разработана подвижная фаза хлористый метилен—метанол—вода (15:10:1,5) и показано, что вышеуказанные соединения имеют величины R_f 0,51; 0,44 и $0,35 \pm 0,03$, соответственно, а подвижность целевого продук-

та инозина составляла $0,40 \pm 0,03$. Было проведено количественное определение инозина с помощью денситометра Shimadzu CS-920 при длине волны 248 нм и установлено, что область линейного сигнала пятна инозина находится в интервале содержания целевого продукта 0,05—1,0 мкг/пятно. Предел количественного определения инозина составляет 0,02 мкг/пятно, $S/N = 12$. Погрешность количественного анализа инозина составляла менее 5,0% при количестве определений, равном 5 ($P 0,95$).

В последние годы проявляется усиленное внимание к процессу биосинтеза, выделения и очистки *тимидина*, поскольку этот нуклеозид является сырьем в производстве лекарственного препарата 3'-дезоксидеокси-3'-азидо-тимидина, который широко используется для ингибирования роста вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [39]. Необходимо отметить, что ранее применяли химический метод синтеза тимидина [1], однако стоимость такого продукта была на порядок выше, чем нуклеотида, полученного путем микробного синтеза. КЖ штамма — продуцента тимидина помимо целевого продукта содержит такие примеси, как тимин, аденозин, уридин, 2'-дезоксидеоксидитидин, цитозин, инозин и некоторые другие нуклеозиды; при этом суммарное содержание примесей варьирует от 7 % до 12%. Для разделения этой смеси нами с помощью модели “Призма” была разработана высокоэффективная подвижная фаза состава: хлороформ—метанол—вода (15:10:3) (рис. 1) [8, 40]. Разделение было выполнено на высокоэффективных пластинках Сорбфил [7], время элюции было равно 20—25 мин; количественное определение проводили на денситометрах Shimadzu CS-920 (Япония) и ДенсиСкан-2 (Россия) при длине волны 267 нм. Предел количественного определения тимидина составил 0,05 мкг/пятно, $S/N = 10$.

Для анализа примесей были рассчитаны коррелирующие факторы отклика (response factors), которые приведены в табл. 3.

Анализ тимидин-содержащих КЖ также проводили методом ВЭЖХ; при этом была показана хорошая корреляция результатов, полученных обоими методами ($r=0,98921$) [41, 42]. Методика количественного определения тимидина прошла процедуру валидации и передана в производство. Необходимо отметить, что эта методика была также использована для постадийного контроля получения препарата 3'-дезоксидеокси-3'-азидо-тимидина.

Акадесин (5-амино-4-карбоксамидоимидазол-1- β -D-рибофуранозид) — природное соединение, аналог и предшественник аденозина. Будучи наряду с АМР активатором протеинкиназы (АМРК),

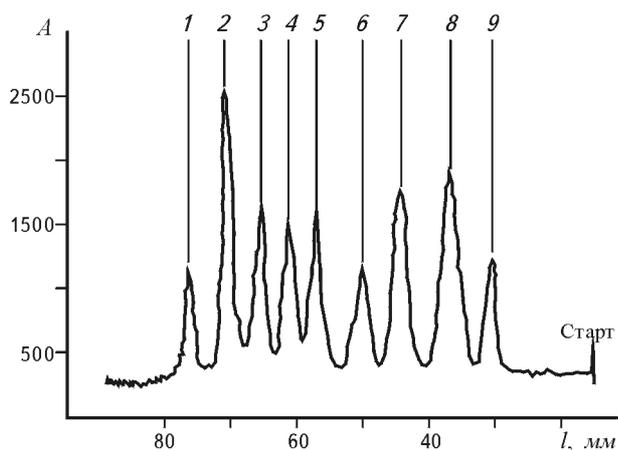


Рис. 1. Разделение с помощью ТСХ на пластинах Сорбфил смеси оснований и нуклеозидов, содержащихся в КЖ продуцента тимидина: 1 — тимин; 2 — тимидин; 3 — аденозин; 4 — 2'-деоксиуридин; 5 — цитозин; 6 — 2'-дезоксцитидин; 7 — уридин; 8 — цитидин; 9 — инозин. А — денситометрический сигнал (денситометр Shimadzu CS-920)

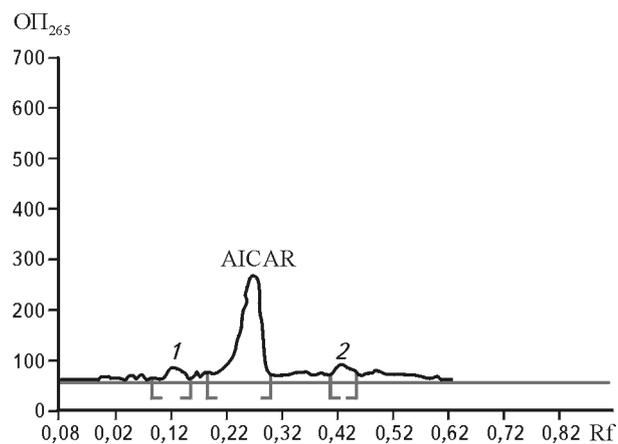


Рис. 2. Денситограмма разделения акадезина и минорных примесей в КЖ продуцента: 1 — инозин, AICAR — акадезин, 2 — гипоксантин. Денситометр Camag TLC Scanner 3

акадезин имеет широкий терапевтический потенциал, нормализуя углеводный и липидный обмен и ограничивая пролиферацию опухолевых клеток [43—46]. Известна его эффективность в предупреждении сахарного диабета второго типа; нельзя переоценить его роль и при лечении хронических и острых лейкозов. Все эти факторы обусловили большой интерес к изучению свойств нуклеозида акадезина, методам его получения и количественного определения.

Акадезин был получен с помощью микробиологического метода, так как химический синтез, как и в случае инозина и тимидина, экономически и экологически невыгоден. Для анализа КЖ штамма-продуцента акадезина, содержащей гипоксантин, ино-

зин, 4-ацетиламида-5-аминоимдазол и гуанозин, использовали ТСХ и ВЭЖХ (в качестве референсного метода). ТСХ проводили на высокоэффективных ТСХ-пластинках Сорбфил с использованием модели “Призма” [40] и подвижной фазы следующего состава: хлороформ—метанол—25%-ный водный аммиак ((17,3—12,1):(14,3—8,4):(2,1—4,3)). Время разделения составило 20—25 мин. Визуализацию пятен акадезина и примесей осуществляли при длине волны 254 нм. Количественно результаты хроматографии оценивали путем денситометрии (приборы Shimadzu CS-920, Япония, и Camag TLC Scanner 3, Швейцария) при длине волны 265 нм (рис. 2). Предел обнаружения акадезина был равен 0,05 мкг/пятно, S/N = 21.

Таблица 3

Факторы отклика нуклеозидов – компонентов КЖ продуцента тимидина при денситометрии продуктов ТСХ на различных пластинках ($\lambda=267$ нм, $n = 6$, $P 0,95$)

Нуклеозид	Пластинки Сорбфил		Пластинки производства фирмы Merck	
	x	$\bar{\varepsilon}$, %	x	$\bar{\varepsilon}$, %
Тимидин	1,00	1,80	1,00	1,70
2'-Дезоксиуридин	1,03	1,20	1,01	1,70
2'-Дезоксцитидин	0,73	1,80	0,67	2,90
Уридин	0,96	0,80	0,94	2,50
Инозин	0,52	1,80	0,54	3,2

Примечание: x – среднее значение фактора отклика при выборке 6 и $\bar{\varepsilon}$ — погрешность среднего измерения.

Таблица 4

Результаты количественного определения акадезина, г/л, в различных образцах КЖ продуцента, выполненного методами ТСХ с денситометрией и ВЭЖХ

Номер образца	ТСХ с денситометрией (денситометр Shimadzu CS-920)		ВЭЖХ	
	Концентрация, г/л	$\bar{\epsilon}^*$, %	Концентрация, г/л	$\bar{\epsilon}$, %
1	2,3	3,5	2,2	1,4
2	3,1	2,4	3,1	2,0
3	3,0	3,3	2,9	2,4
4	2,7	1,9	2,9	3,5
5	3,9	2,6	4,0	1,9

n = 3; P 0,95, r = 0,99350

* См. примечание к табл. 3.

В табл. 4 представлены результаты количественного определения акадезина в образцах КЖ различных партий, полученных методами ТСХ с денситометрией и ВЭЖХ. Как видно из данных табл. 4, результаты обоих методов хорошо коррелируют друг с другом, $r = 0,99350$.

С практической точки зрения важно знать, как долго и в каких условиях можно хранить препараты стерильной КЖ штамма-продуцента акадезина. Для этих целей в конце ферментации (72 ч) КЖ стерильно разливали по пробиркам и выдерживали в течение 2 сут, 4, 6, 8 и 10 сут при темпера-

туре 20°, 4° и —18°. По истечении каждого из этих сроков пробы анализировали методом хромато-денситометрии (табл. 5).

Было установлено, что при хранении КЖ при указанных выше температурах в течение 10 сут содержание в ней акадезина не изменяется.

Также было проведено изучение термической устойчивости акадезина (99,6% чистоты) в водных растворах (рН 6,5). Было показано, что акадезин не претерпевает деструкции в водном растворе при 97° в течение 25 мин [47, 48].

Таблица 5

Количественное определение акадезина, г/л, методом хромато-денситометрии в образцах КЖ продуцента после хранения при различной температуре

Срок хранения, сут	Температура хранения					
	20°		4°		-18°	
	C*, г/л	$\bar{\epsilon}$, %	C, г/л	$\bar{\epsilon}$, %	C, г/л	$\bar{\epsilon}$, %
2	11,3	4,2	11,4	4,6	11,3	3,1
4	11,4	3,7	11,1	4,7	11,2	4,0
6	11,2	4,1	11,2	3,5	11,3	4,5
8	11,0	4,9	11,1	4,6	11,1	4,4
10	11,3	3,7	11,3	4,1	11,1	3,3

n = 3; P 0,95

* C — концентрация продукта; см. также примечание к табл. 3.

Методика количественного определения акадизина методом хроматоденситометрии валидирована [48], а препарат передан на доклинические испытания.

В заключение следует отметить, что представленный в обзоре материал может быть полезен для отечественных исследователей в условиях импортозамещения.

Получено 17.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Шабарова З.А., Богданов А.А.* Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1987. — 564 с.
2. *Маиковский М.Д.* Лекарственные средства. Т.2. — 14-е изд. — М.: Новая волна, 2000. — 539 с.
3. *Hand Book of Thin-Layer Chromatography* [Eds. J.Sherma, V.Fried]. — N-Y: Marcel Dekker Inc, 2007. — 1126 p.
4. *Camag Bibliography service.* Camag CD-Rom disc. — Version 102. — Muttenz, 2001.
5. *Camag Bibliography service.* Camag CD-Rom disc. — Version 108. — Muttenz, 2012.
6. *Merck, Catalog 2014—2015.* — Darmstadt.: Merck, 2014. — 869 p.
7. *Беленький Б.Г.* Состав для получения хроматографического слоя ТСХ пластин / Б.Г. Беленький, Э.С. Ганкина, Л.С. Литвинова, И.И. Малахова // Журн. прикл. хим. — 1982. — Т. 55. — С. 443—448.
8. *Красиков В.Д.* Основы планарной хроматографии. — СПб.: Химиздат, 2005. — 232 с.
9. *Hand Book of Thin-Layer Chromatography* [Eds. J.Sherma, V.Fried]. — N-Y.: Marcel Dekker, Inc., 2003. — 983 p.
10. *Pfeffer, A.M.* Identification of Adenosine in biological Samples / A.M. Pfeffer, M.P. Tolliman, K.I. Kovar, // J. Planar. Chrom. — 1996. — V. 10. — P. 31—34.
11. *Morden, W.* Separation Nucleosides and Bases by HPTLC with Identification by Fendem Mass-spectrometry / W. Morden, L.D. Wilson // J. Planar. Chrom. — 1995. — V. 8. — P. 98—102.
12. *Cserhati, T.* Interaction of Antiviral Nucleosides with Gamne Cyclodextrin / T. Cserhati, E. Forgos, G. Sagi // J. Liq. Chromat. and Related Technol. — 1999. — V. 22. — P. 125—135.
13. *Wu, Y.* Analisis adenine metabolism in Potato by Thin Layer Chromatography / Y. Wu, B. Li // Chinese J. Chromatogr. — 1996. — V. 14. — P. 75—86.
14. *Mao, L.* Determination of Adenosine in Zhuguash shusib by Thin Layer Chromatography / L. Mao, P. Jue // J. Chinese. Herb. Med. — 1993. — V. 24. — P. 467—478.
15. *Leonard, S.A.* Quantition of 5-Methylcytidine by High Performance Thin Layer Chromatography / S.A. Leonard, J.W. Nyee // J. Chromat. — 1993. — V. 645. — P. 189—192.
16. *Figueira, M.* Separation of Adenosine and its derivatives by Thin Layer Chromatography on Silica Gel / M. Figueira, J. Ribeiro // J. Chromat. — 1985. — V. 325. — P. 317—325.
17. *Vicerkova, H.* Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides from 3'-o-Formyl-(N-acetyl) / H. Vicerkova, J. Smrt // Cool. Crech. Chem. Comm. — 1983. — V. 48. — P. 1323—1333.
18. *Smrt, J.* 3'-o-Formyl-(N-acetyl)-2'-deoxynucleotides as a binding units in the synthesis of oligo deoxyribonucleotides // Cool. Crech. Chem. Comm. — 1982. — V. 47. — P. 2157—2169.
19. *Lidgren, G.* Separation of Adenosine and it derivatives by Thin Layer Chromotography on silica gel / G. Lidgren, L. Bohlein // J. Natur. Prod. — 1988. — V. 51. — P. 1277—1280.
20. *Feldberg, R.S.* Separation of Adenosine and it derivatives by Thin Layer Chromotography on silica gel / R.S. Feldberg, L.M. Reppucci // J. Chromatogr. — 1987. — V. 410. — P. 228—229.
21. *Egerhati, T.* Separation of some synthetic nucleosides on silica gel layers // J. Chromatogr. — 1991. — V. 543. — P. 425—438.
22. *Randford, J.R.* The estination of DNA contamination in RNA and anzyme preparations / J.R. Randford, R.F. Martin // Anal. Biochem. — 1982. — V. 127. — P. 116—130.
23. *Chollat, A.* Improved synthesis of oligoribonucleotides by solid phase phosphotriester method / A. Chollat, E.I. Ayala // Helv. Chimese. Acta. — 1984. — V. 67. — P. 1356—1364.
24. *Wang, S.H.* Quality evaluation of Synthetic Oligonucleotides by high performance thin Layer chromatography / S.H. Wang, L. Ma // Chinese J. Chromatogr. — 1993. — V. 11. — P. 146—148.
25. *Vampa, G.* Determination of the reactivity of uridine derivatives by high performance thin-layer chromatography / G. Vampa, S. Bevensuti, P. Pecovari // J. Chromatogr. — 1992. — V. 604. — P. 261—265.
26. *Miksik, I.* Chromatographic separation of glycated nucleosides / I. Miksik, Z. Hodny, Z. Deyl // J. Chromatogr. — 1993. — V. 612. — P. 57—66.
27. *Zhov, B.* Determination nucleosides in some plant drugs Dioscorea apposite by thin-layer / B. Zhov, S. Luo, H. Cai // J. Chromatogr. — 1994. — V. 25. — P. 13—15.
28. *Valko, K.* Comparative investigation of the retention behavior of nucleoside derivatives by thin-layer chromatography / K. Valko, T. Scerhat, E. Forgass // J. Chromatogr. — 1991. — V. 550. — P. 667—675.
29. *Davis, L.C.* Dinucleosides analogues as inhibitors of Thimidine Kinase Thimidylate Kinase and Ribonucleotide Reductase / L.C. Davis, A.A. Stock, E.B. Barry, R.M. Oil // Med. Chem. — 1988. — V. 31. — P. 1305—1308.
30. *Muns, T.W.* Separation of nucleosides from methylated DNA by two-dementional thin-layer chromatography / T.W. Muns, K.C. Potradz, P.A. Katzman // J. Chromatogr. — 1973. — V. 401. — P. 76—81.
31. *Soder, O.* Identification of Molecular Target of thymidylate Kinase activitated Thymidylate Kinase activator by thin-layer Chromatography // Anal. Biochem. — 1983. — V. 123. — P. 236—241.
32. *Alecsandrova, K.M.* Thin Layer Chromatography of some nucleobases and nucleosides on silica gel / K.M. Alecsandrova, M. Leaderev // Coll. Szech. Chem. Comm. — 1983. — V. 48. — P. 304—311.

33. *Krasikov, V.D.* Quantitative determination of Industrial Free amino Acids by Planar Chromatography / V.D. Krasikov, I.I. Makhova, E.V. Degterev, B.V. Tyaglov // *J. Planar. Chromatogr.* — 2004. — V. 17. — P. 113—121.
34. *Van Gennip, H.A.* Application TLC and HPTLC for Detection aberrant purine and pyrimidine metabolism in man / H.A. Van Gennip, G.M. Abeling, D.D. Korte // *Chromatogr. Sci.* — 1991. — V. 55. — P. 863—903.
35. *Тяглов Б.В.* Применение электроосмотической ТСХ с малолетучей подвижной фазой для разделения нуклеозидов / Б.В. Тяглов, А.О. Балушкин, В.Г. Березкин // *Завод. лаб.* — 2005. — Т. 71. — С. 3—6.
36. *Казаринова Л.А.* Влияние различных компонентов среды на биосинтез инозина культурой *Bacillus subtilis*. *Gen. 265* / Л.А. Казаринова, М.А. Кострикина // *Микробиол. пром.* — 1974. — Т. 4. — С. 8—12.
37. *Балабушевич М.И.* Влияние поверхностно активных веществ на биосинтез инозин-5-монофосфата / М.И. Балабушевич, Л.И. Ерохина, Л.А. Казаринова // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1983. — Т. 19. — С. 720—727.
38. *Лукин Н.С.* Влияние аденозина на биосинтез инозин-5'-монофосфата, *gen. 225-5* / Н.С. Лукин, Л.А. Казаринова, М.И. Балабушевич // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1980. — Т. 16. — С. 178—184.
39. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. Т. 1. — 14-изд. — М.: Новая волна, 2000. — 606 с.
40. *Nyevedy, Sz.* TLC mobile phase optimization procedure using “PRIZMA” model / Sz. Nyevedy, C.A. Edelmeir, B. Meier // *Planta Med.* — 1985. — P. 241—253.
41. *Кузнецов Э.В.* Количественное определение тимидина и сопутствующих нуклеозидов в ферментационных растворах / Э.В. Кузнецов, Н.В. Королькова, А.С. Миронов, Б.В. Тяглов, А.И. Заика, А.С. Исаев // *Биотехнология.* — 1995. — № 9. — С. 60—63.
42. *Красиков В.Д.* Количественное определение нуклеозидов в биологических жидкостях / В.Д. Красиков, И.И. Малахова, Б.В. Тяглов, А.С. Миронов // *Журн. прикл. хим.* — 2011. — Т. 83. — С. 312—317.
43. *Charton, J.C.* Synthesis and biological properties of benzimidazole derivatives as potent AMP-activated protein kinase / J.C. Charton, M.A. Fontaine, F. Fonfelle // *Bioorg. Med. Chem.* — 2006. — V. 14. — P. 4490—4518.
44. *Chen, X.* Determination of 5-aminoimidazole-4-carboxamide in human plasma / X. Chen, J. Jing, G. Wang // *J. Chromatogr. B.* — 2007. — V. 855. — P. 140—144.
45. *Gleng, X.* HPTLC method for determination of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and its active metabolite in mice plasma / X. Gleng, L. Guo, L. Li, W. Lu. // *J. Chromatogr. B.* — 2013. — V. 916. — P. 64—70.
46. *Tomas, A.* Quantificatoin of urinary aicar concantratoin in doping control / A. Tomas, S. Denck, O. Krug, M. Kamber // *Anal. Biochem.* — 2010. — V. 396. — P. 2899—2908.
47. *Антонова С.В.* Количественное определение препарата айкар в культуральных жидкостях методом количественной тонкослойной хроматографии / С.В. Антонова, А.С. Миронов, Б. В. Тяглов, Е.Д. Барсуков, Н.Г. Демина, Н.Ф. Румянцева, Л. Эрраис Лопес, Н.В. Королькова, К.В. Лобанов, Р.С. Шакулов // *Биотехнология.* — 2011. — № 4. — С. 211—215.
48. *Антонова С.В.* Количественный хроматографический анализ культуральных жидкостей штаммов-продуцентов акадесина / С.В. Антонова, А.С. Миронов, Б.В. Тяглов, Е.Д. Барсуков, Н.Г. Демина, Н.Ф. Румянцева, Л. Эрраис Лопес, Н.В. Королькова, К.В. Лобанов, Р.С. Шакулов // *Аналитика.* — 2012. — № 3. — С. 18—22.

S.V. ANTONOVA¹, N.G. DEMINA¹, K.V. LOBANOV¹, T.A. KUYAEV¹, A.S. MIRONOV¹, A.A. PUSHKOV¹, N.F. RUMIANTSEVA¹, B.V. TYAGLOV^{1,*}, R.S. SHAKULOV¹, I.I. MALAKHOVA², and V.D. KRASIKOV²

¹The Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), 117545, Moscow Russia

²The Scientific and Production Center *Lenchrom*, 199004, St.-Petersburg Russia

e-mail: b_tyaglov@genetika.ru

Analysis of Natural Nucleosides and their Derivatives by Thin-Layer Chromatography

The recently published data on the separation and quantification of natural nucleosides and some of their derivatives by thin-layer chromatography on silica gel have been summarized. The use of more than 20 mobile systems for the separation of more than 52 nucleosides and derivatives was discussed; in a few cases, the conditions for their densitometry quantitative analysis after the TLC separation were regarded. The works performed in GosNIIGenetika on the determination of inosine, thymidine and acadesine using here-made Sorbfil plates were reviewed in detail.

Key words: densitometry, HPLC, nucleosides, thin-layer chromatography.

* Author for correspondence.