

## GAS CHROMATOGRAPHY IN MEDICINE

K. N. ZELENIN

*One of modern analytical methods, the method of gas chromatography, is described. The capabilities of this method are illustrated with its applications to clinical and biological tasks.*

**Рассматривается один из современных аналитических инструментальных методов – метод газовой хроматографии. Возможности метода иллюстрируются его применением в медико-биологических исследованиях.**

# ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В МЕДИЦИНЕ

К. Н. ЗЕЛЕНИН

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург

**Введение.** Знакомство школьников с аналитическими химическими методами обычно ограничивается отдельными пробирочными реакциями. Между тем современный арсенал физико-химических методов анализа чрезвычайно широк, а чувствительность и избирательность многих из них могут поразить воображение даже искушенного специалиста. Цель статьи – ознакомиться с одним из современных аналитических методов и получить представление о том, какие возможности метод дает хотя бы в одной из практических областей. Для этого выбран метод газовой хроматографии в приложении к медицинским проблемам.

Хроматография включает группу аналитических методов, применяемых для разделения смесей соединений на основании определенных физических свойств отдельных веществ. Принцип, лежащий в основе процесса, – избирательное распределение компонентов смеси между двумя несмешивающимися фазами: подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой могут быть твердое вещество или жидкость, закрепленная на пористом носителе, а подвижной – жидкость или газ.

Честь открытия хроматографии принадлежит русскому ботанику М.С. Цвету, который в 1903 году впервые разделил растительные пигменты. Тогда Цвет писал: “Следовало ожидать ... что всевозможные порошкообразные вещества окажут воздействие на хлорофилловые пигменты в лигроиновых растворах, и возникла надежда, что систематическое изучение вопроса бросит некоторый свет на сущность адсорбционных явлений и позволит выработать на их основании новый метод физического отделения веществ”. Вот как в 1942 году английский химик Стрейн оценил открытие Цвета: “Был предложен новый остроумный метод химического анализа, которому предназначено оказать влияние на жизнь человечества и всего живого мира”. Несудивительно, что другой английский химик предлагал назвать этот метод “цвет-анализом”, чтобы отдать должное М.С. Цвету. Принятое название метода “хроматография” в переводе с греческого означает “цветотпись” и перекликается с именем первооткрывателя.

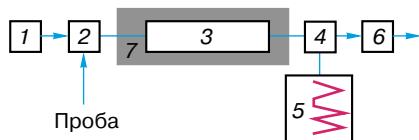
К настоящему времени разработано множество видов хроматографических техник: колоночная, тонкослойная, бумажная, ионообменная, весь спектр электрофоретических методов, аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная,

сверхкритическая жидкостная и, наконец, газовая хроматография. Впервые идея использования газа в качестве подвижной фазы была высказана Мартином и Синджем (1941 год), а практически реализована Джеймсом и Мартином (1952 год) в разделении летучих жирных кислот.

**В чем суть метода?** Газовая хроматография – универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. При этом компоненты разделяемой смеси перемещаются по хроматографической колонке с потоком инертного газа (газа-носителя). Разделяемая смесь многократно распределяется между газом-носителем (подвижной фазой) и нелетучей неподвижной жидкой фазой, нанесенной на инертный материал (твердый носитель), которым заполнена колонка. Принцип разделения – неодинаковое сродство органических веществ к летучей подвижной фазе и стационарной фазе в колонке. Компоненты смеси селективно удерживаются неподвижной фазой, а затем выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигналы детектора записываются в виде хроматограммы автоматическим потенциометром (самописцем) или же регистрируются на экране компьютера. Эффективность разделения смеси растет с увеличением числа элементарных актов распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

Разделение многокомпонентных проб и их регистрация находят применение в нефтяной, металлургической, химической, фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности. С повышением экологических требований к среде обитания, продуктам, лекарствам можно ожидать еще более широкого внедрения газовой хроматографии в повседневную жизнь. Оправдано и понятно применение газовой хроматографии в рутинном анализе, например бензина или природного газа.

**Устройство газового хроматографа.** Газовый хроматограф отличается замечательной простотой. Несмотря на многочисленные усовершенствования, ключевые компоненты его конструкции неизменны (рис. 1). Основные узлы газового хроматографа следующие: источник газа-носителя и блок подготовки газов, испаритель, термостат колонок и сами



**Рис. 1.** Принципиальная схема газового хроматографа: 1 – газ-носитель, 2 – испаритель, 3 – хроматографическая колонка, 4 – детектор, 5 – самопищий регистратор, 6 – измеритель скорости потока, 7 – термостат.

хроматографические колонки, детектор, система регистрации и обработки данных.

Испаритель служит для перевода жидкой пробы в паровую фазу. Объем жидкой пробы, вводимой шприцем-дозатором, не превышает 10 микролитров.

**Сердце газового хроматографа – хроматографическая колонка.** Существуют два основных типа колонок: насадочные и капиллярные. Насадочные колонки представляют собой стеклянные или металлические трубы длиной от 1 до 5 м со внутренним диаметром от 1,5 до 5 мм. Они заполнены “насадкой” – твердой основой с нанесенной на нее неподвижной фазой. В качестве твердой основы используются различные пористые вещества, на поверхности которых должна образоваться тончайшая пленка неподвижной фазы.

Можно использовать саму стенку колонки как твердую основу. Тогда речь идет о капиллярной колонке. Технология изготовления капиллярной колонки – это нанесение на стенку длинного капилляра из кварцевого стекла (как правило, до 30 м) тончайшего слоя неподвижной фазы. Эта технология позволила существенно улучшить параметры разделения смесей. У капиллярных колонок предпочтение отдают малым диаметрам (0,25 мм).

**Число стационарных фаз безгранично.** Для выполнения хроматографического анализа необходимо подобрать характеристики колонки. Наиболее важный этап – выбор стационарной фазы. Неподвижная фаза должна соответствовать следующим критериям: химическая стойкость, низкое давление пара в диапазоне рабочих температур колонки, достаточные коэффициенты распределения, достаточная селективность по отношению к исследуемым веществам, низкая вязкость. В повседневной практике используются сотни жидкых фаз, обладающих хорошими коэффициентами разделения к различным классам веществ. Жидкая фаза наносится на твердый носитель, обладающий большой удельной поверхностью, прочный и химически инертный. Чаще всего это особым образом подготовленные диатомитовые земли или полимерные адсорбенты.

**Температуру и скорость газа-носителя можно варьировать в широких пределах.** Использование легких газов-носителей (гелий) ускоряет анализ, а относительно тяжелых (азот) улучшит качество разделения в ущерб скорости. Скорость газа выбирают экспериментально для удовлетворительного разделения компонентов смеси и максимального ускорения анализа. Так как характер разделения находится в зависимости от температуры, хроматографическая колонка размещается в программируемом термостате. Разделение смеси веществ с широким диапазоном температур кипения начинают при низкой температуре термостата, а затем программируют постоянное повышение температуры для элюирования высококипящих компонентов. Казалось бы, с увеличением

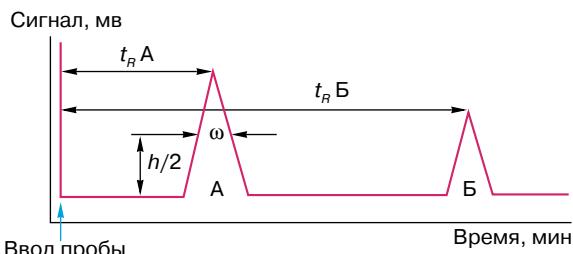
длины колонки и уменьшением скорости передвижения эффективность разделения должна возрастать. На практике, однако, при этом вещества размываются из-за диффузии. Поэтому существует оптимальный компромисс между эффективностью работы колонки, диффузией и временем анализа.

**Выбор детектора – ключ к успеху.** Эволюция газовой хроматографии во многом – история совершенствования способов детектирования. Детектор фиксирует изменение какого-либо физического свойства газа-носителя при попадании в поток исследуемого вещества. В настоящее время в практике газовой хроматографии применяются следующие основные виды детекторов: детектор по теплопроводности (катарометр), пламенно-ионизационный детектор, термоионный детектор, детектор электронного захвата, масс-спектрометр. Кроме того, достаточно широко применяются фотоионизационный детектор, детектор хемилюминесценции, атомно-эмиссионный детектор, спектрофотометрические детекторы.

Выбор детектора принципиально важен для анализа биологических проб. Критериями выбора являются чувствительность и диапазон применения. Катарометр позволяет определить вещество, содержание которого в пробе составляет  $10^{-3}\%$ . Чувствительность ионизационных детекторов к органическим веществам значительно выше ( $10^{-8}\%$ ). Для термоионного детектора чувствительность по отношению к фосфорсодержащим соединениям возрастает еще на 3–4 порядка. Электронозахватный детектор практически нечувствителен к соединениям без атомов галогенов, зато по отношению к полигалогенпроизводным на 2–3 порядка чувствительнее, чем ионизационно-пламенный детектор. Таким образом, при правильном выборе колонки, детектора и с учетом малого объема пробы *предел обнаружения веществ методом газовой хроматографии составляет  $10^{-12}$ – $10^{-13}$  г*, что превосходит многие другие методы анализа.

**Что такое хроматограмма?** Каждому компоненту смеси на хроматограмме соответствует отдельный пик (рис. 2). Время от начала хроматограммы до появления вершины пика называется *временем удерживания* ( $t_R$ ). При строгом воспроизведении всех условий время удерживания является такой же физико-химической характеристикой вещества, как его плотность, показатель преломления и т.д.

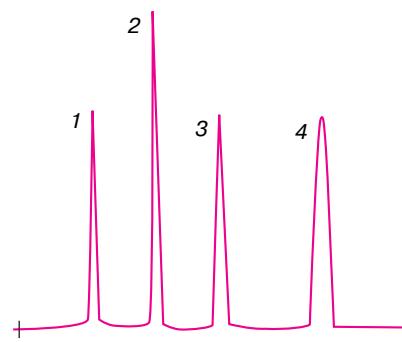
Определение качественного состава смеси проводится путем сопоставления времени удерживания данного компонента и эталона – вещества известной структуры. Совпадение времени удерживания эталона и определяемого компонента может указывать на их идентичность. Эталон чаще всего добавляется в исследуемую смесь (метод метки). При этом число пиков на хроматограмме не должно изменяться, а интенсивность пика одного из компонентов должна увеличиваться.



**Рис. 2.** Типичная хроматограмма. А, Б – пики соответствующих компонентов,  $t_R$  А и  $t_R$  Б – время удерживания соединений А и Б,  $h/2$  – полувысота пика А,  $\omega$  – ширина пика А на его полувысоте.

Определение количественного состава смеси основано на допущении того, что интенсивность пика каждого компонента пропорциональна его содержанию в смеси. В качестве меры интенсивности принимается площадь пиков  $S$ . Обычно для этого умножают его высоту  $h$  на ширину  $\omega$ , измеренную на полувысоте пика:  $S = h\omega$ . Конкретным примером хроматограммы может служить хроматограмма смеси карбоновых кислот (рис. 3). Анализ данных в современных хроматографах автоматизирован. Как правило, полученные данные обрабатываются ЭВМ, сопоставляются с базами данных, подвергаются статистической обработке.

**Хромато-масс-спектрометрия – новый этап.** Применение масс-спектрометра в качестве детектора



**Рис. 3.** Хроматограмма смеси карбоновых кислот: 1 – уксусная, 2 – пропионовая, 3 – масляная, 4 – валериановая.

газового хроматографа явилось событием такого масштаба, что потребовало самостоятельного наименования. Эта комбинация называется хромато-масс-спектрометрия. Масс-спектрометр обладает способностью не только зарегистрировать появление в нем разделяемого компонента, но и установить его структуру. Широкое применение хромато-масс-спектрометров вызвало необходимость создания гигантских библиотек – баз данных масс-спектров всевозможных соединений. Итак, в методе

газожидкостной хроматографии (ГЖХ) широко варьируются температура, скорость газа-носителя, параметры хроматографической колонки, жидкая фаза, тип детектора. Это создает совершенно уникальные условия для решения различных аналитических задач.

### Медицинские приложения газовой хроматографии

Газовая хроматография используется во многих областях медицины: в гигиене и экологии для определения содержания вредных примесей в воздухе, воде и пищевых продуктах; в токсикологии и судебной медицине для диагностики отравлений техническими жидкостями (хлорпроизводными углеводородов, алкоголем и его суррогатами) и пестицидами самой различной структуры; в фармакологии и фармации для контроля качества препаратов, исследования метаболизма лекарственных средств. Любой из этих примеров мог бы стать предметом отдельного разговора, но мы остановимся лишь на некоторых аспектах использования газовой хроматографии в клиническом анализе.

Применение газовой хроматографии в биохимических целях сравнительно долго не получало должной оценки. Считалось, что биологические объекты недостаточно летучи и малоустойчивы к различным физико-химическим воздействиям, применяемым в газохроматографическом анализе. Успехи в разработке методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов и превращение их в летучие соединения открыли широкую дорогу для применения метода в биохимическом анализе.

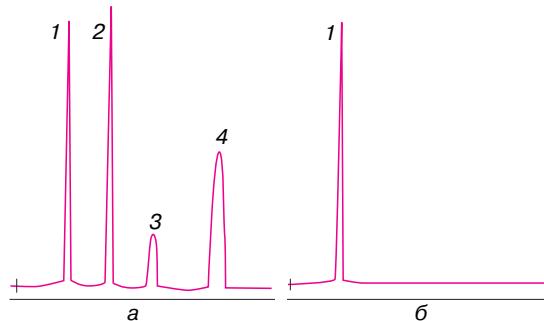
**Анализ карбоновых кислот не устаревает.** В исследовании липидов, в особенности жирных кислот, газовая хроматография произвела настоящую революцию и до настоящего времени не имеет альтернативы. Первым анализом, выполненным с помощью газовой хроматографии, стало определение Джеймсом и Мартином карбоновых кислот. В процессе метаболизма микробные клетки производят низшие карбоновые кислоты, причем набор кислот является как бы визитной карточкой того или иного микроорганизма. Самый авторитетный справочник по таксономии, то есть по классификации микроорганизмов, «Определитель Bergey» содержит сведения о наборе карбоновых кислот, вырабатываемых в процессе сбраживания различных субстратов разными микроорганизмами.

Традиционные пути идентификации микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний или гнойно-воспалительных процессов включают в себя несколько этапов: посев биологического материала на питательные среды, затем получение чистых (то есть состоящих из одинаковых микробов) культур, выращивание их на средах обогащения и лишь затем их идентификацию по характеру разрушения тех или иных субстратов. Даже для микроор-

ганизмов, обладающих способностью к быстрому росту, эти этапы исследования занимают не менее двух суток. С помощью газовой хроматографии можно проводить ускоренную (менее двух часов) идентификацию микроорганизмов по спектру специфических компонентов их мембран или специфическим продуктам пиролиза.

**Угроза газовой гангрены.** Каждый двадцатый раненый в годы второй мировой войны страдал от гнойно-септических осложнений, вызванных анаэробными бациллами – возбудителями газовой гангрены. Успехи в лечении позволили снизить число осложнений, вызванных анаэробными микроорганизмами почти в 100 раз. Немалую роль в этом сыграл тот факт, что определение карбоновых кислот сделало возможным верификацию диагноза анаэробной инфекции в течение нескольких часов, тогда как традиционные бактериологические методы дают ответ в лучшем случае через 4–5 суток. В качестве примера на рис. 4, а дана хроматограмма гноя из плевральной полости при анаэробном сепсисе: а – до лечения, б – после двухнедельного лечения антибиотиком цефалоспорином; 1 – уксусная кислота, 2 – пропионовая, 3 – масляная, 4 – изовалериановая.

Исследования состава липидов крови привели к пониманию проблемы атеросклероза – болезни, ведущей к появлению ишемической болезни сердца, нарушениям мозгового кровообращения. Для практической медицины разработаны простые и эффективные средства диагностики нарушений метаболизма липидов. В повседневной практике врачи ежедневно назначают исследования холестерина, триглицеридов, липопротеидов. При разработке этих рутинных методик газовая хроматография использовалась как референтный метод, то есть метод-эталон. Широкое внедрение во врачебную практику исследований метаболизма липидов



**Рис. 4.** Хроматограмма гноя из плевральной полости при анаэробном сепсисе: а – до лечения, б – после двухнедельного лечения антибиотиком цефалоспорином; 1 – уксусная кислота, 2 – пропионовая, 3 – масляная, 4 – изовалериановая.

позволило разработать пути профилактики и лечения атеросклероза.

Возможность определения индивидуального состава жирных кислот тех или иных липидов является чрезвычайно мощным инструментом в познании структуры и функции биологических мембран, процессов внутриклеточного метаболизма. Энергетическое обеспечение клетки осуществляется в так называемом цикле трикарбоновых кислот – цикле Кребса. Газохроматографическое определение спектра карбоновых кислот цикла Кребса внесло большой вклад в понимание интимных процессов внутриклеточного метаболизма при различных патологических состояниях.

**Мы и наши микробы.** Углубление знаний о человеке, понимание того, что человеческий организм является своеобразным микрокосмом, привело к появлению новой науки – микробной экологии человека. Человеческий организм представляет собой систему сложных локальных экосистем кожи, барьерных слизистых оболочек, кишечного содержимого. Нарушение экологического равновесия в любой из этих систем приводит к весьма серьезным последствиям. Ярким примером является кишечный дисбактериоз. При нарушении равновесия в системе микробы кишечника – организм-хозяин изменяется сам характер пищеварения. В норме у человека белки и углеводы перевариваются и всасываются в тонкой кишке, которая в физиологических условиях почти стерильна (от  $10^5$  до  $10^8$  микробов на 1 г содержимого), а грубая растительная клетчатка попадает в толстую кишку, где подвергается воздействию ферментных систем анаэробных микроорганизмов. Количество микробных тел в толстой кишке ( $10^{14}$ ) на два порядка(!) превышает общее число клеток человеческого организма. Образовавшиеся в процессе переваривания клетчатки карбоновые кислоты выполняют важные для организма функции: питание клеток эпителия толстой кишки, угнетение канцерогенеза (то есть ракового перерождения) в клетках кишечного эпителия, регуляцию микробного биоценоза. При дисбактериозе пищеварение становится симбионтным – анаэробные микроорганизмы заселяют тонкую кишку, утилизируют питательные компоненты и лишают организм питания, повреждают нежную слизистую тонкой кишки своими мощными ферментными системами.

Осуществить контроль дисбактериоза традиционными бактериологическими средствами нереально. Выполнение одного детального обследования на дисбактериоз требует свыше года трудозатрат в человеко-часах. Альтернатива этому исследованию – установление спектра карбоновых кислот в кишечном содержимом методом ГЖХ как интегрального показателя микробного состояния кишечника.

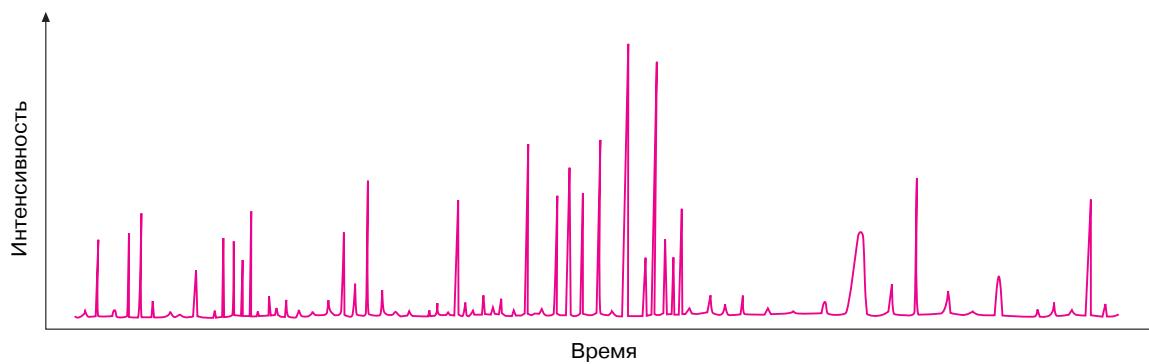
**Пероксисомные заболевания – новая опасность.** Сравнительно недавно открыто семейство наследственных заболеваний – пероксисомные заболева-

ния. Пероксисомы, мельчайшие органеллы (части тела клеток), обнаруженные более четверти века назад, сейчас привлекают к себе все большее внимание. Метаболической функцией пероксисом является окисление жирных кислот, некоторых гормонов и т.д. Особенностью пероксисом является то, что они ответственны за окисление тех жирных кислот, которые неохотно метаболизируются иными органеллами. Пероксисомы превращают эти гидрофобные вещества в более гидрофильные.

Пероксисомные нарушения проявляются в задержке развития, поражении нервной и эндокринной систем, нарушении функции ряда внутренних органов. Практически для всех пероксисомных нарушений характерно накопление в клеточных мембранах и плазме крови так называемых очень длинных насыщенных жирных кислот с длиной цепи 24–28 углеродных атомов. В настоящее время газовая хроматография – самый эффективный метод для определения этих веществ.

Было бы неверно полагать, что газовая хроматография используется только в анализе карбоновых кислот. Разработаны и применяются методы газохроматографического анализа спиртов, альдегидов, аминокислот, углеводов, нуклеотидов, стероидов и других соединений. Для части перечисленных выше соединений газовая хроматография стала отправной точкой, позволившей разработать более практические методики. В частности, методом газовой хроматографии определяют увеличение содержания ацетона, гептанона-2 и других кетонов при сахарном диабете. Диагностическим показателем цирроза печени служат ароматические кислоты, накопление фенилуксусной кислоты свидетельствует о некоторых заболеваниях нервной системы. Для контроля состояния ожоговых больных определяют производные углеводов – маннитол и лактулозу. Газовая хроматография дает возможность количественно оценить весь клинически значимый спектр стероидов из одной пробы. Подобный анализ незаменим в диагностике некоторых болезней (при нарушениях функции желез внутренней секреции – надпочечников, заболеваниях половой сферы). Были разработаны методы определения так называемых катехоламинов – адреналина, норадреналина – и родственных им соединений, гормонов щитовидной железы, гормонов надпочечников.

**Окись азота – новые горизонты.** Говоря о клеточном метаболизме нельзя не упомянуть, что по существующим сегодня представлениям весь набор внутриклеточных сигналов опосредуется так называемыми вторичными биорегуляторами. Их множество. Для нашей же цели наиболее интересен один – окись азота (NO), к которой сейчас приковано внимание мировой медицинской общественности. Выяснено, что через посредство NO реализуется механизм расширения кровеносных сосудов. Именно этому обязаны жизнью тысячи пациентов,



**Рис. 5.** Метаболический профиль органических компонентов мочи здорового человека.

принимающих нитроглицерин (в биосредах нитроглицерин трансформируется в окись азота). Предполагается, что наличие NO в некоторых нервных окончаниях связано с его участием в реализации механизмов восприятия боли и памяти. Окись азота так или иначе участвует в осуществлении реакций воспалительного каскада, механизмах гибели клеток. Пока единственным прямым методом определения NO в тканях является газовая хроматография.

**Будущее за метаболическими профилями.** Технический прогресс сделал возможным получение так называемых метаболических профилей биосред: крови, мочи, слюны, выдыхаемого воздуха. В одном образце анализируются несколько сот компонентов. В принципе необязательно даже знание состава компонентов метаболического профиля. Метаболические профили так же индивидуальны, как и отпечатки пальцев, но в отличие от папиллярных узоров хроматограмма метаболитов человеческого организма несет массу медицинской информации: какие лекарства или продукты получал человек в последнее время, каким микроорганизмом вызвано его заболевание и многое другое. В качестве примера на рис. 5 приведен метаболический профиль мочи, содержащий свыше сотни достоверно идентифицированных компонентов.

Компьютерный анализ метаболических профилей является одним из мощнейших инструментов диагностики врожденных и приобретенных нарушений метаболизма, таких заболеваний, как сахарный диабет, подагра, алkaptonурия, разветвленно-цепочечная кетонурия – “болезнь кленового сиропа”, фенилкетонурия и др.

Еще не всегда можно объяснить причины формирования того или иного метаболического профиля. Например, анализ спектра насыщенных и ненасыщенных кислот и их количественных соотношений в мемbrane клеток крови с успехом применяется для определения прогноза при сепсисе. Отсутствие удовлетворительной гипотезы, объясняющей это явление, не мешает его практическому применению.

**Заключение.** Итак, газовая хроматография – один из самых мощных аналитических методов,

разработанных во второй половине нашего столетия. Применение ее в медицине носит как прикладной, так и исследовательский характер. Основные направления – исследования нарушений метаболизма липидов, в частности жирных кислот, углеводов, органических кислот, аминосоединений. Традиционные сферы практического применения – медицинская микробиология и диагностика врожденных нарушений метаболизма. Перспективой применения газовой хроматографии является концепция метаболических профилей – систем интегральной оценки метаболизма. С унификацией основных техник газовой хроматографии, ростом чувствительности детекторов станет возможно повседневное использование метаболических профилей в целях практической диагностики.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Л.: Химия, 1978.
2. Вяхирев Д.А., Шушунова А.Ф. Руководство по газовой хроматографии. М.: Высш. шк., 1987.
3. Айвазов Б.В. Основы газовой хроматографии. М.: Высш. шк., 1977.
4. Литвинов Л.Д., Руденко Б.А. Газовая хроматография в биологии и медицине. М.: Медицина, 1971.
5. Березкин В.Г. Хроматографический анализ окружающей среды. М.: Химия, 1979.
6. Яворская С.Ф. Газовая хроматография – метод определения вредных веществ в воздухе и биологических средах. М.: Медицина, 1972.
7. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М.: Медицина, 1978.
8. Тогузов Р.Т. Хроматография в биологии и медицине. М.: МОЛГМИ, 1985.

\* \* \*

Кирилл Николаевич Зеленин, профессор, зав. кафедрой химии Военно-медицинской академии, доктор химических наук, член-корреспондент Российской Академии естественных наук, заслуженный деятель науки Российской Федерации. Автор более 250 научных публикаций. Область научных интересов: органическая химия азотистых соединений и гетероциклов.