



УДК 543.544+615.00

Эпоксиреагент Хуберта в конструировании адсорбентов аффинного типа, используемых в хроматографии лекарственных веществ и природных соединений

Дудин А.А., Кузнецов П. В., Халахин В.В., Сухих А.С.

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово

Поленок Е.Г.

Институт экологии человека СО РАН, Кемерово

Поступила в редакцию 10.03.2010 г.

Аннотация

В обзоре рассмотрена стратегия и тактика применения в аффинном синтезе малоизученного эпоксиреагента Хуберта. Акцентируются проблемы дополнительной перешивки эпоксиадсорбентов на его основе. Показаны перспективы применения адсорбентов аффинного типа, синтезированных на основе реагента Хуберта, в различных вариантах аффинной хроматографии.

Ключевые слова: эпоксиреагент Хуберта, адсорбенты аффинного типа, аффинный синтез

Epoxyreagent of Hubert in designing affinity adsorbents type used in chromatography of drugs and natural compounds.

The review examined the strategy and tactics used in the synthesis of the affine poorly epoxyreagent of Hubert. The emphasis is more problems remaking epoxyadsorbents based on it. Showing perspectives of affinity-type adsorbents synthesized on the basis of reagent Hubert, in various versions of affinity chromatography.

Keywords: epoxyreagent of Hubert, adsorbents of affinity-type, affine synthesis

Введение

Хорошо известно, что среди многочисленных методов активации полимерных матриц при получении разнообразных адсорбентов аффинного типа (ААфТ) способ эпоксиактивации занимает лидирующее место [1-3]. Это связано не только с высоким качеством эпокси-ААфТ (высокая гидролитическая стабильность, реакционная способность), но и с возможностью оригинальной дополнительной химической модификации (перешивки) эпоксиносителя, например эпихлоргидрином (ЭХГ), ещё на стадии эпоксидирования по схеме, представленной на рис.1 [2].

Несмотря на то, что такие перешитые эпоксиносители показали, по данным [4-7], высокую селективность в очистке белков сыворотки крови человека, этот феномен, предложенный нами впервые, до сих пор систематически не изучен [2].

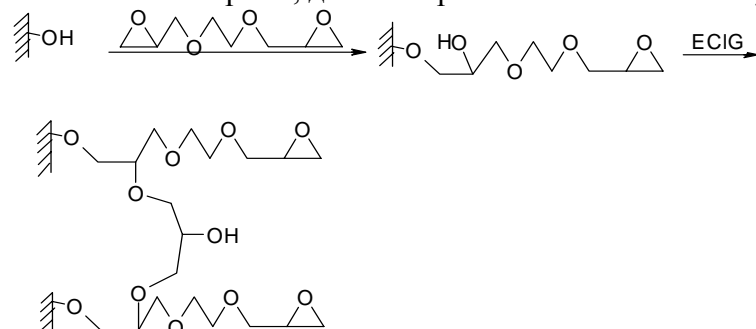


Рис. 1. Общая схема эпоксиактивации и перешивки гидроксил содержащих матриц. где: EClG – эпихлоргидрин [2]

Впервые реактив Хуберта (диглицидиловый эфир 1,2 –этандиола, ДГЭЭД) как новый перспективный реагент проимиджирован нами в 1993 году в обзоре [3], посвященном способу эпоксиактивации. Интересно, что полиглицидиловые эфиры многоатомных спиртов и их аналоги изучались в качестве компонентов полиэпоксидных смол в работах Трофимова и соавт. ещё в 80-90годы прошлого века [8-13], но применения в качестве эпоксиактивирующих агентов различных аффинных матриц так и не нашли [2]. Тем не менее, например, C₁₈-содержащий бисэпоксианалог (рис.2) безусловно мог применяться не только в аффинном синтезе (АфС) как эпоксиактиватор разных носителей, но и в синтезах кремнеземных адсорбентов для высокоэффективной аффинной жидкостной хроматографии (ВАЖХ) [14]. Частично информация о его применении в АфС изложена в обзоре по перспективам аффинной хроматографии (АфХ) в XXI веке [15].

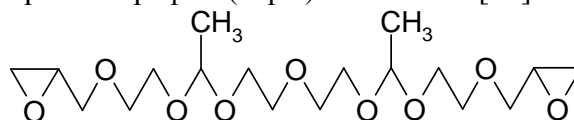


Рис. 2. Ди-1-[2-(глицидилокси)этокси]этиловый эфир диэтиленгликоля

Более подробно некоторые особенности его использования (как нового реагента АфС) рассмотрены в работе [2], но эти публикации полной картины его применения и перспектив все-таки не дают.

В настоящем обзоре сделана попытка восполнить вышеназванные пробелы, дополнив общую картину известными нам литературными данными последних лет (2000-2010 гг.). К сожалению, и сегодня ДГЭЭД все ещё не задействован в АфС адсорбентов для различных вариантов классической аффинной хроматографии: металлхелатной, борлигандной, гидрофобной и др. [2, 3, 7,]. Не использовался он, как эпоксиреагент, в мембранной АфХ, в АфХ нуклеотидов и их аналогов [3]. Отсутствуют данные о применении реактива Хуберта для синтеза полимеров с молекулярным узнаванием (фантомная хроматография) [2, 16, 17,]. Судя по данным Лисичкина Г.В. и соавт. [14, 17, 18], ДГЭЭД ещё не занял достойного места и в синтезах кремнеземных ААфТ. Интересно подчеркнуть, что и в недавно изданной за рубежом энциклопедии по АфХ [19] метод эпоксиактивации полимерных матриц рассмотрен крайне схематично, скупо, без ссылок на наши отечественные классические обзоры [1, 15] по данной теме. К сожалению, и в статье, посвященной юбилею хроматографии [20] работы российских ученых в области АфХ (за

исключением статьи А.А. Сердана) фактически не представлены. Тем не менее в недавнем обзоре [21] по выделению и очистке тироксинсвязывающих белков убедительно показаны перспективы применения синтезированных на основе реактива Хуберта аффинных адсорбентов.

Несколько лучшая ситуация по его применению сложилась в области неклассической АфХ (НАфХ), предложенной Кузнецовым и сотрудниками в начале 90-х годов XX века для изучения процессов выделения, разделения, очистки и анализа некоторых типов природных соединений, лекарственных средств [2, 3, 7]. Так, недавно нами начато изучение перспектив применения нового поколения эпоксиадсорбентов, полученных на основе ДГЭЭД, в химии гуминовых и гуминоподобных веществ [22-30]. Показано, что эпоксиадсорбент с новокаиновым лигандом на основе универсального носителя сефадекса LH-20, активированного ДГЭЭД, оказался оптимальным при изучении качества препарата ФиБС [22]. Азо-ААфТ с флавоноидными лигандами, синтезированные на основе ДГЭЭД, оказались наиболее интересными в разделении и исследовании ноотропных препаратов [31].

Известно, что впервые ДГЭЭД применён в конце 80-х гг. XX-го века японскими учеными для стабилизации биопротезов [32]. Он используется также в синтезах некоторых хиральных сорбентов на основе кремнезема [14]. К середине 90-х годов XX века ДГЭЭД уже внедрён в практику кардиохирургов кузбасскими учеными Барбараш Л.С., Журавлевой И.Ю. и др. [33]. В 2005-2008 гг. эта группа исследователей изучала и ряд новых эпоксимодификаторов для консервации клапанов сердца [34, 35], где особый интерес для нужд АфС вызывает пентаглицидиловый эфир α -D-глюкопиранозы (синтезирован в Иркутском институте химии им. А.Б. Фаворского СО РАН) [36] следующей структуры (рис.3).

Понятно, что исследования эпоксимодификаторов этого типа пока для метода АфХ не проводилось как, впрочем, и реагента Хьюсдена [2].

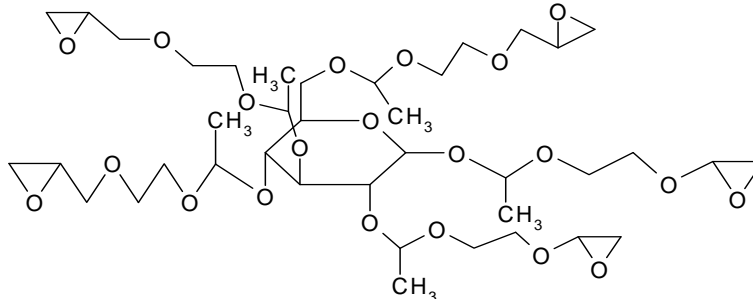


Рис. 3. Структура 1,2,3,4,6-пента-о-{1-[2-(глицидилокси)этокси]этил}- α -D-глюкопиранозы

В методе АфХ Хуберт и соавторы впервые применили диглицидиловый эфир 1,2-этандиола при синтезах полигидроксильных ААфТ [2, 37]. Фактически ДГЭЭД является аналогом широко известного в АфС реактива Сандберга – Пората, диглицидилового эфира 1,4-бутандиола [2]

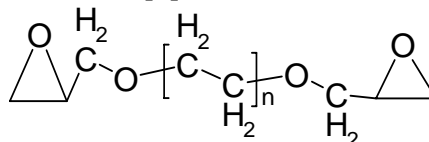


Рис. 4. Общая формула некоторых бис-эпоксиреагентов: n=2 (реактив Хуберта); n=4 (реактив Сандберга-Пората) [2]

Позднее, в середине 90-х годов, судя по данным Tomaz S. T. et al [38], ДГЭЭД – аналог следующей структуры:

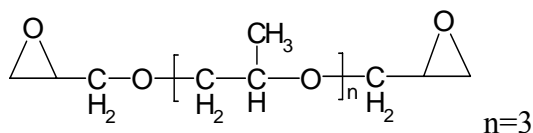


Рис. 5. Общая структура некоторых разветвлённых аналогов бис-эпоксиреагентов [38]

Он был использован для получения эпоксиадсорбента: полипропиленсефарозы CL-6B. Однако синтезированный эпоксиадсорбент показал недостаточную эффективность в очистке целлюлаз (β - глюкозидаза и др.) в сравнении с его гидрофобными аналогами (бутил-сефароза и др.), а также диольным аналогом эпоксисефарозы CL-6B [38-47].

Теоретическая часть

Первые работы авторов [48, 49] показали определенную нестабильность при эпоксиактивации реагентом Хуберта ряда полимерных матриц (сефароза и др.), что, видимо, было связано с невысоким качеством данного реагента (получен лабораторным путем). Позднее, с конца 90-х годов XX века, уже с использованием коммерческого препарата, было показано, что ДГЭЭД достаточно гладко эпоксиактивирует (около 20-35 мкмоль эпоксигрупп на 1 мл влажного геля) не только агарозные носители, но и полимерные матрицы на основе декстранов (сефадексы G-10,25,100; сефадекс LH-20). Примерно с тем же выходом эпоксицировались и перешитые агарозные гели типа сефароза CL-4B, CL-6B и др. [3]. Конкретные методики стабильной ДГЭЭД-активации описаны в ряде наших работ [2, 3]. Интересно отметить, что кроме известных межфазных катализаторов (МФК) (соли тетраалкиламмония) в процесс эпоксицирования на основе ДГЭЭД удалось ввести и поливинилбутиловый эфир [2, 3]. Заманчивые перспективы открываются и при использовании в качестве МФК разнообразных краун-соединений, хотя такие примеры известны пока только при эпоксиактивации носителей эпихлоргидрином [2, 3]. В работе [50] показано применение азо-ААФТ, эпоксицированных эпихлоргидрином и диглицидиловым эфиром 1,2-этандиола, в НАФХ для разделения флавоноидов и родственных соединений. В качестве лигандов были использованы лекарственные вещества (тетрациклин, новокаинамид, витамин B₁) и некоторые природные соединения (морин, троксевазин). Данные по указанному феномену проиллюстрированы в табл.1.

В работе [49] были получены сравнительные результаты разделения модельных смесей фенольных соединений на различных азо-ААФТ с эпоксиактивирующими реагентами эпихлоргидрином и реагентом Хуберта. Показано, что более полярные гели, активированные диглицидиловым эфиром 1,2-этандиола лучше разделяют неполярные смеси, в отличие от более гидрофобных с короткой ЭХГ-вставкой гелей. На рис.6. показан пример разделения модельной смеси метилкофеат-кофейная кислота.

Как видно из представленных в табл.1 результатов на большей части проверенных полимерных ААФТ наблюдается полное или частичное разделение данных модельных смесей, кроме смеси рутин+7-рутинозид лютеолина (ААФТ с новокаинамидным лигандом). Интересно отметить, что смесь, содержащая цинаротризид (как наиболее полярная, содержит три сахарных остатка) полностью разделилась на всех исследуемых адсорбентах. Это хорошо коррелируется с

данными работы [49], где высокополярные глюкуроныды флавоноидов выходили в первых хроматографических фракциях.

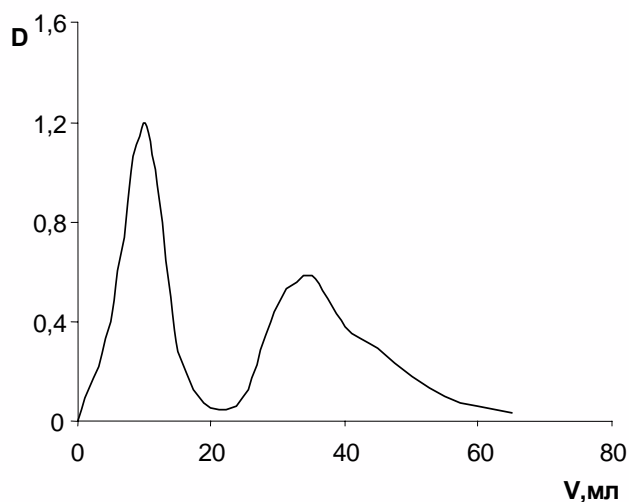


Рис. 6. Хроматографический профиль разделения смеси метилкофеат-кофейная кислота. Тип геля: матрица-ДГЭЭД- морин; пик1 – кофейная кислота, пик2 – метилкофеат [49]

Таблица 1. Разделение модельных смесей флавоноидных гликозидов на полимерных ААФТ (фрагмент) [50]

Тип эпокси-реагента	Тип лиганда	Рутин+7-рутинозид лютеолина*	Цинаротризид+7-рутинозид лютеолина	Цинарозид+7-рутинозид лютеолина	Миквелианин+Рутин+изокверцитрин
ЭХГ	Троксевазин	±	+	+	±
ЭХГ	Новокаин-амид	-	+	+	+
ДГЭЭД	Морин	+	+	±	+
ДГЭЭД	Троксевазин	+	+	±	±

Примечание. * - анализируемые модельные смеси. «+» - полное разделение, «-» - отсутствие разделения, «±» - частичное разделение.

Как правило, ДГЭЭД-активированные матрицы в дальнейшем модифицировались нами с образованием эпоксиазо-ААФТ по схеме, представленной на рис.7.

Известно использование в качестве лигандов-модификаторов также синтетических аналогов эстрогенов (диэтилстильбэстрол, синэстрол), некоторых катехоламинов и их аналогов (адреналин, изадрин, мезатон и др.), п-аминобензоилглутаминовой кислоты [2]. Эпоксиазо-ААФТ, полученные по РВ-пути на основе реактива Брайтона-Маршалла, рассмотрены также в работе [2]. Последние, в отличие от аналогов на основе гидразида салициловой кислоты (окрашены в желто-оранжевый цвет; азо-форма), имеют фиолетово-бурую окраску. Все эпоксиазо-ААФТ легко дают дитионитную пробу с дитионитом натрия с потерей окраски [2].

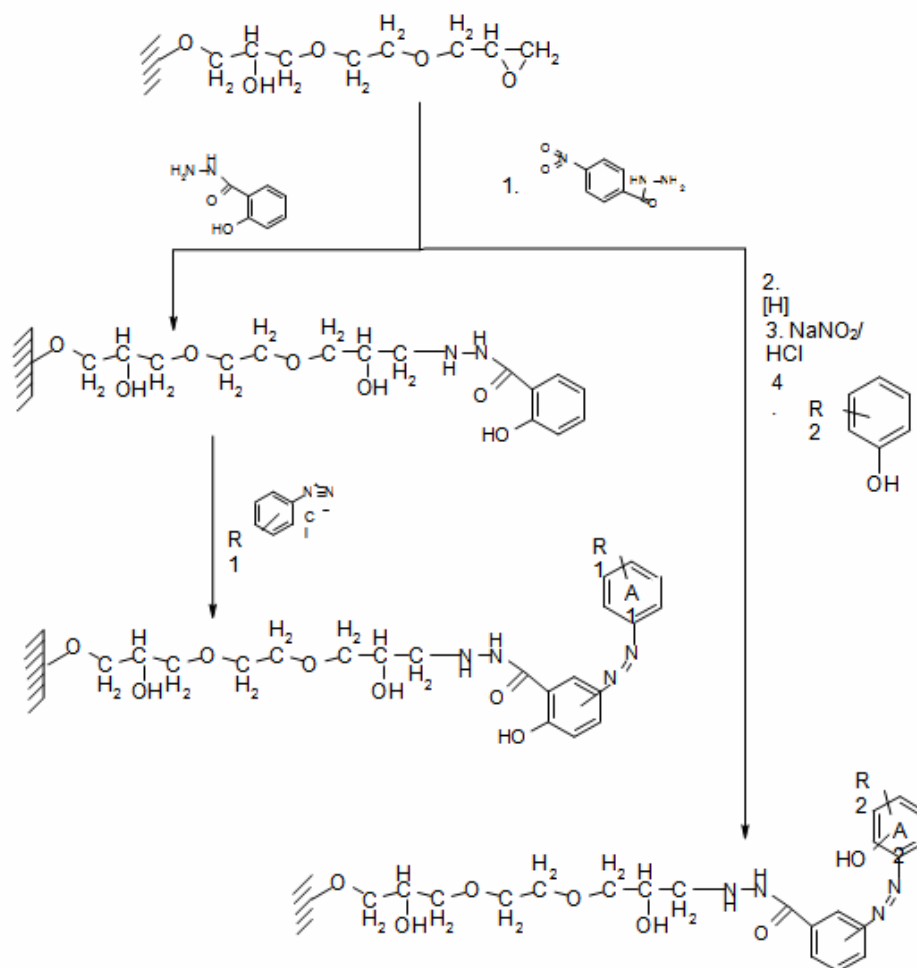


Рис. 7. Получение эпоксиазомодифицированного геля.

A₁ – разнообразные лиганды-модификаторы: анестетики, сульфаниламиды и др.;

A₂ – лиганды-модификаторы фенольного типа: резорцин, 8-оксихинолин, флавоноиды и др.

По нашим данным [2], азо-ААФТ, модифицированные реактивом Брайтона-Маршалла, более «капризны» в работе – требуется длительная, очень тщательная промывка их водно-органическими растворителями при упаковке в колонки. Интересно отметить, что их кремнеземные аналоги этого типа были синтезированы и использованы в методе АфХ еще в 70-80 гг. XX века [14].

В числе новых лигандов-модификаторов, введенных нами недавно в структуру азо-ААФТ – *p*-нитроанилин, дигидрокверцитин и 4-аминоантипирин [29]. Последний активно используется в реакции азосочетания (РАС) в качестве диазокомпоненты. Адсорбенты на его основе обладают четким индикаторным эффектом классических азоиндикаторов (метилловый оранжевый и др.) и могут применяться как полимерные индикаторы [2].

В последнее время особый интерес представляют предложенные нами лиганды-модификаторы на основе ванилингидразонов *o*-гидрокси (амино)-бензойных кислот и их йод-производных с общей формулой:

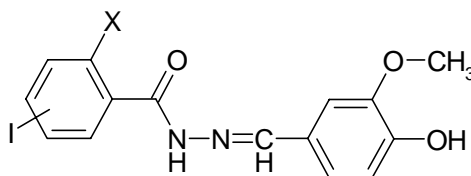


Рис. 8. Общая структура лигандов-модификаторов - ванилингидразонов [53].
X = -OH; -NH₂; J = 1,2

Эти соединения легко вступают в РАС по 3-метокси-4-гидрокси фрагменту с образованием оригинальных эпоксиазаадсорбентов [51-54]. Безусловно, в качестве лигандов-модификаторов для целей АфС могут быть также интересны салициловый альдегид, пиридоксальфосфат, его аналоги и др.

Интересно, что до сих пор отсутствуют эпоксиазаадсорбенты (на основе ДГЭЭД), имеющие в качестве лигандов производные витамина В₆ (пиридоксин, пиридоксаль и их аналоги), которые могли бы использоваться и для выделения, очистки пиридоксальзависимых ферментов методом классической АфХ.

Примеры использования различных ДГЭЭД-активированных азо-ААфТ, как в области классической АфХ (КАфХ) для выделения и очистки белков, так и в неклассической АфХ (НАфХ) постоянно расширяются. В недавно опубликованной работе [55] использован для исследования препаратов Гинкго Билоба эпоксиаза-ААфТ с лигандом-модификатором 4-амино-антипирином следующей структуры (рис.9)

Данный азо-ААфТ получен по классическому реверсному пути [2], а в качестве лигандов-модификаторов в его структуре присутствуют гидразид салициловой кислоты и лекарственное средство антипирин (в настоящее время он исключен из перечня лекарственных средств). Интересно, что 4-амино-антипирин в качестве лиганда предложен нами впервые [29].

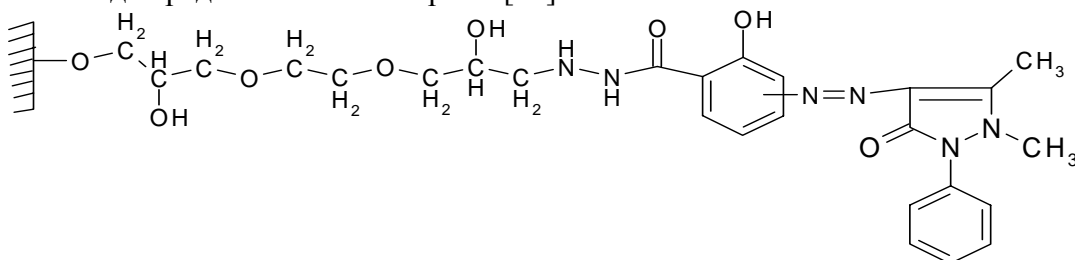


Рис. 9. Адсорбент аффинного типа с лигандом - модификатором антипирином [29]

Данный адсорбент был применен для предварительного фракционирования растительного препарата экстракта Гинкго Билоба (Танакан, EGB 761, Франция)

В качестве примера на рис. 10. приведен общий вид хроматограммы, полученной методом ГЖХ-МС фракции № 1.

Ключевыми веществами фракций мы считаем соединения представленные в табл. 2.

Эти данные показывают возможные перспективы применения азо-ААфТ в тандемных хроматографических режимах при исследованиях образцов разнообразных природных соединений, в том числе и лекарственных веществ.

В работе [31] на ДГЭЭД-активированных азо-ААфТ проводился скрининг модельных смесей состоящих из следующих ноотропных веществ: гаммоксина 0,05 г/л, глипрофена 0,2 г/л, мефебута 0,2 г/л, фенотропила 0,2 г/л, фенибута 0,25 г/л,

пикамилона 0,05 г/л, танакана (Egb 761) 0,002 г/л. Результаты скрининга приведены в таблице 3, примеры хроматографического разделения приведены на рис. 11-13.

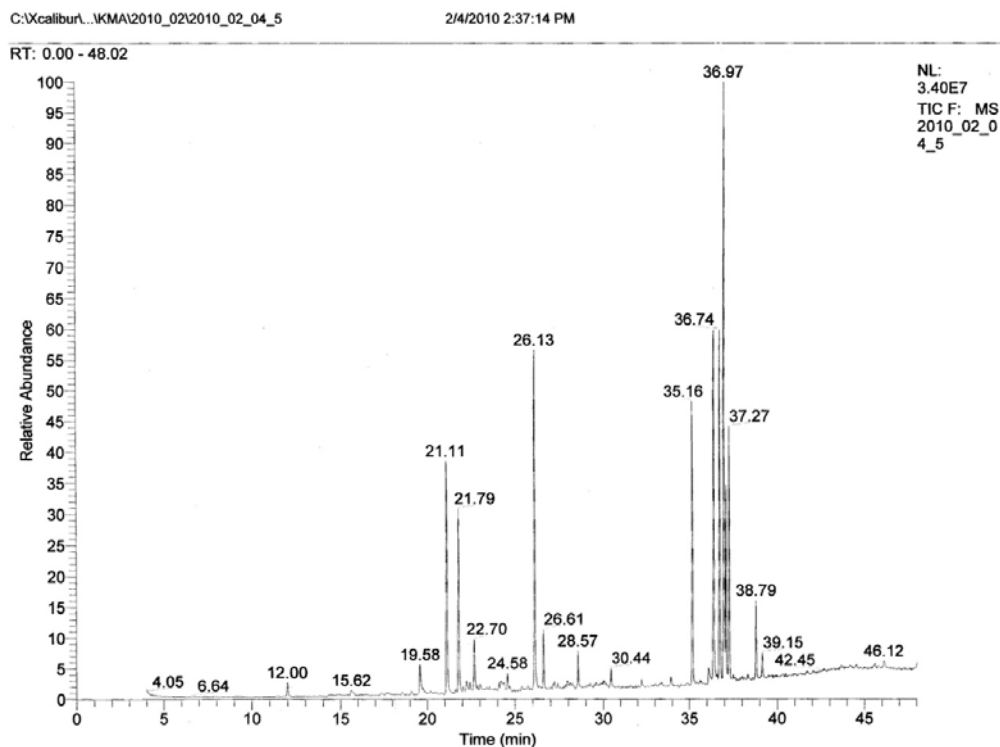


Рис. 10. Хроматограмма, полученная методом ГЖХ-МС фракции №1 экстракта Гинкго Билоба [55]

Таблица 2. Ключевые вещества фракций препарата экстракта Гинкго Билоба [55]

Анализируемый объект	Обнаруженное вещество
Фракция №1	1,1-дибензил-бутилен-1
	Транс-1,2-дифенилциклобутан
	2-фенил-3-[(фенилсульфинил)метил]циклопропилбензол
	[(1-метил-2,2-дифенилциклопропил)сульфинил]бензол
	N,N-диметил,S-1,3-дифенил-2-бутеновый эфир тиокарбаминовой кислоты
	[(1-метил-2,2-дифенилциклопропил)сульфинил]бензол (изомер)
	3-(2-циклопентенил)-2-метил-1,1-дифенлпропен-1
	[(1-метил-2,2-дифенилциклопропен)сульфинил]бензол (изомер)
	N,N-диметил,S-1,3-дифенил-2-бутеновый эфир тиокарбаминовой кислоты (изомер)
Фракция №2 Разбавление 1:2 (ацетонитрил)	9,12,15-триеноктодекановой кислоты пропан 1,3-диол-2-оат
	Этил гексадеканоат
	2-гексадеканол
	2-(октадецилокси)этиловый эфир октодекановой кислоты
Фракция №3	Дибензо[с,г] циклогептадиен-7-оксо-циклобутан
	24,25-дигидрооксихолекальциферол

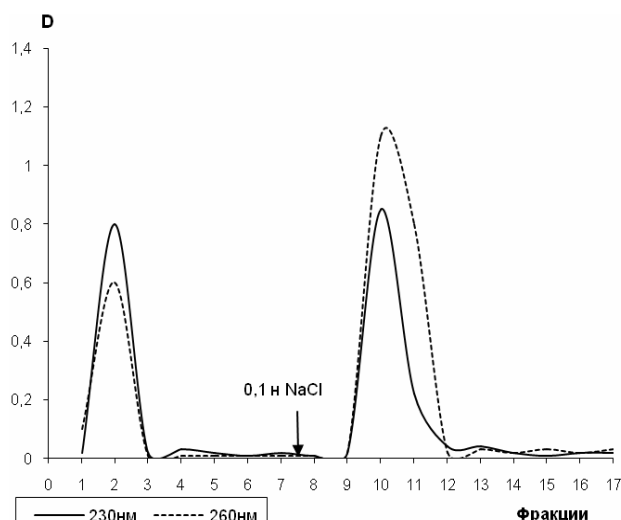


Рис. 11. Пример полного хроматографического разделения смеси фенибут-пикамилон (тип геля сефадекс G-10-БЭП-пНБГ-троксерутин): пик1 – фенибут, пик2 – пикамилон [31]

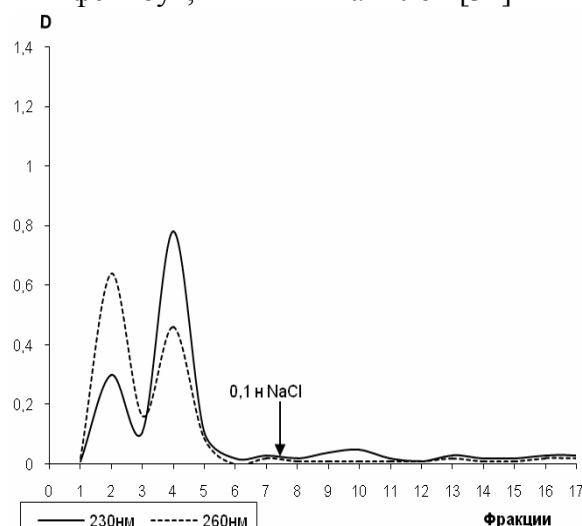


Рис. 12. Пример частичного хроматографического разделения смеси пикамилон-фенибут (тип геля сефадекс G-10-БЭП-ГСК-новокаин): пик1 – пикамилон, пик2 – фенибут [31]

Интересны работы [4-6], в которых используются ДГЭЭД-активированные адсорбенты с иммобилизованными производными салициловой кислоты для аффинной хроматографии белков сыворотки крови. Хроматографический скрининг синтезированных ААфТ показал, что ДГЭЭД-активированные адсорбенты обладают повышенной селективностью, в отличие от ЭХГ-активированных аналогов. Так, ДГЭЭД-ААфТ с иммобилизованным гидразидом 3,5-дийодсалициловой кислоты адсорбировал в 2,5 раза меньше белка по сравнению с ЭХГ-активированными аналогами (табл. 4).

Аналогичные результаты отмечены в работах [4-6,21] с использованием ААфТ, активированных ДГЭЭД, после дополнительной модификации ЭХГ по бисэпоксидному фрагменту. Представляется крайне интересным исследование данных сверхперешитых гелей в таких вариантах аффинной хроматографии как иммунная и рецепторная (шведские исследователи, 70-е гг. XX века) [2] без дополнительной модификации низкомолекулярными соединениями. К сожалению, в

недавно изданной энциклопедии по аффинной хроматографии [19] перспективы такого рода даже не обсуждаются.

Таблица 3. Результаты разделения исследуемых модельных смесей НП [31]

Тип геля	Смесь №1	Смесь №2	Смесь №3	Смесь №4	Смесь №5	Смесь №6	Смесь №7	Смесь №8	Смесь №9	Смесь №10	Смесь №11	Смесь №12
G-10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
G-10- ДЭЭГ -ГСК-новокаин	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	+	-
G-10- ДЭЭГ - ГСК-троксерутин	+	*	*	*	-	+	+	+	*	*	+	+
G-10- ДЭЭГ - пНБГ -рутин	+	+	+	+	-	-	+	+	-	*	+	+
G-10- ДЭЭГ - пНБГ - дигидрокверцетин	+	+	+	+	-	-	+	+	-	*	+	+
LN-20	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
LN-20- ДЭЭГ - ГСК-новокаин	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
LN-20- ДЭЭГ - ГСК-4-амино-антипирин	*	-	*	*	+	-	-	*	-	*	+	*
LN-20- ДЭЭГ - ГСК-п-нитроанилин	-	-	-	*	+	-	-	-	-	-	+	-
CL-6В	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
CL-6В -ДЭЭГ-пНБГ -новокаин	*	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
CL-6В -ДЭЭГ-пНБГ -8 Оксихинолин	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
CL-6В - ДЭЭГ - пНБГ - Морин	+	+	+	*	-	-	+	+	-	-	+	-
CL-6В - ДЭЭГ - пНБГ - дигидрокверцетин	+	+	+	*	-	-	+	+	-	-	+	-
CL-6В - ДЭЭГ - пНБГ -рутин	+	+	+	-	-	-	+	+	-	*	+	-
CL-6В - ДЭЭГ - пНБГ - кокарбоксилаза	+	+	+	-	-	-	+	+	-	*	+	-
CL-6В - ДЭЭГ - пНБГ -АТФ	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-

"-"разделения нет, "+"полное разделение смеси, "*" тенденция к разделению.

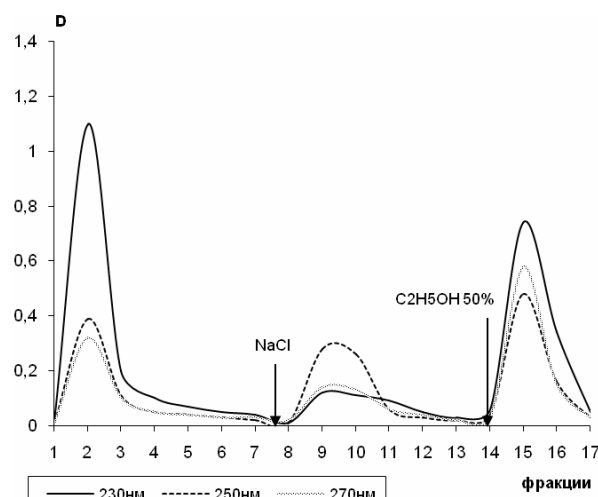


Рис. 13. Пример хроматографического разделения смеси гаммоксин-Экстракт Гинкго билоба (тип геля сефадекс G-10-БЭП-пНБГ-лиганд флавоноидного типа(рутин, троксерутин или дигидрокверцетин)):пик 1 – гинколидная фракция, пик 2 – гаммоксин, пик 3 – флавоноидная фракция [31]

Таблица 4. Характеристика эпоксиактивированных агарозных гелей [6]

Параметры/ Тип лиганда	Концентрация лиганда, мкМ/мл		Ёмкость ААфТ по белку, мг/мл	
	ЭХГ- агароза	ДГЭЭД- агароза	ЭХГ- Агароза	ДГЭЭД- агароза
1.Гидразид салициловой кислоты	6	4	0.05	0.13
2.Гидразид 5-йодсалициловой кислоты	7	7	0.16	0.16
3. Гидразид 3,5-дийодсалициловой кислоты	6	6	0.61	0.23
4. Гидразид фенолфталеина	9	4	0.34	0.07
5. Гидразид тетрайодфенолфталеина	6	4	0.52	0.28
6. Тироксин	11	8	0.18	0.20

Анализ состава адсорбируемых белков показал, что наиболее селективным адсорбентом оказался ДГЭЭД-активированный ААфТ с иммобилизованным гидразидом 5-йодсалициловой кислоты следующей структуры:

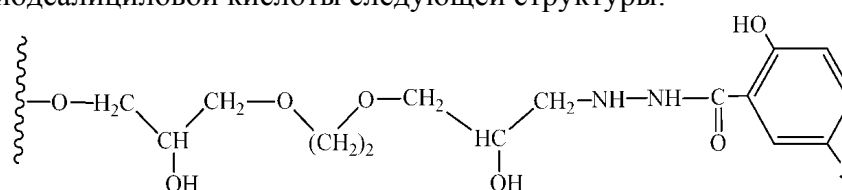


Рис. 14. Адсорбент аффинного типа с лигандом гидразидом 5-йодсалициловой кислоты [6]

Такой ААфТ сорбирует только три белка: тироксинсвязывающий глобулин (ТСГ), альбумин и иммуноглобулин G. Причем концентрация ТСГ в 2 раза выше по сравнению с классическим ААфТ с иммобилизованным тироксином [21].

Кроме йодсалицилатных лигандов, в работах [5-7] показано успешное применение йодированных фталеинов и аналогов *p*-аминобензойной кислоты. ДГЭЭД-активированные ААфТ адсорбировали в 2-4 раза меньше белков, чем их ЭХГ-аналоги (табл.4). Однако в отличие от салицилатных аналогов эпоксиактивированные ААфТ с производными фенолфталеина оказались менее селективными. В перспективе, крайне интересно изучить для выделения, разделения и очистки белков сыворотки крови человека и йодированные аналоги антраниловой кислоты, которая изостерна (по аминогруппе) салициловой кислоте. Тем более, что в работах [51-53] уже показан синтез галоидированных аналогов антраниловой кислоты.

Сейчас ведется работа по изучению сорбционной способности производных гидразида антраниловой кислоты в отношении белков сыворотки крови человека. По предварительным данным, ААфТ с иммобилизованным гидразидом антраниловой кислоты сорбировал три белка – альбумин, иммуноглобулины М и G. В отличие от салицилатных аналогов такой адсорбент обладал меньшей сорбционной емкостью (табл. 5). Также проводилось исследование гелей с иммобилизованным препаратом фтивазидом и гидразонами – производными салициловой и антраниловой кислот. Гели с иммобилизованными фтивазидом и ванилингидразоном йодантраниловой кислоты показали большую сорбционную емкость по белку, что, по нашему мнению, свидетельствует о меньшей селективности данных типов лигандов. В данном случае в качестве матрицы использовалась сефароза 4В, концентрация активных эпокси групп составила около 15 мкМ/мл.

В области НАфХ отметим наши последние работы по изучению качества известного лекарственного препарата ФиБС [23], успешное разделение модельных смесей ноотропных препаратов [56]. Недавно методом НАфХ начато изучение сложного состава препаратов Гинкго Билоба [54, 55], Звездчатки средней [57], различных видов Копеечника [58].

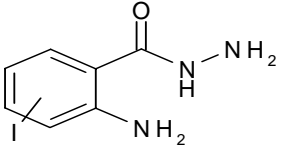
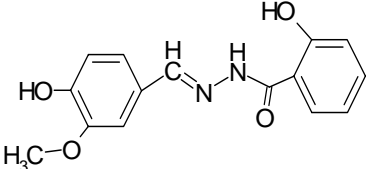
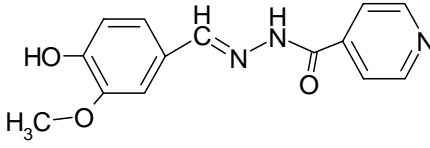
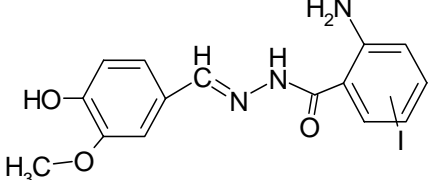
Наконец, отметим внедрение азо-ААфТ в исследовании гуминовых и гуминоподобных веществ [22-30]. Подчеркнем, что это направление в химии гуминовых веществ предложено отечественными учеными впервые в мировой практике. Проблемы и перспективы применения метода АфХ в этой области рассмотрены в обзоре [59].

Недавно японские ученые использовали [60] диглицидиловый эфир 1,2-этандиола как вставку при химической модификации магнитных наночастиц, которые применяли для аффинной очистки метотрексат противоопухолевого агента. В работе [61] при использовании хитозановых носителей для извлечения ионов серебра, свинца и др. среди кросс-сшивающих агентов были использованы глутаровый альдегид, ЭПХ и ДГЭЭД. Для получения новых импритинг-полимеров на основе 3-метакрил-оксипропил-триметилсилана ДГЭЭД применили как кросс-сшивающий реагент. Полученный сополимер показал хорошую аффинность и высокую селективность узнавания для креатинина [62].

В работе [63] использовали графт-полиметакрилатные носители, в которые молекула цистеина была встроена за счет реактива Хуберта, как сшивающего агента. Полученный носитель в режиме фантомной хроматографии (хроматография на полимерах с молекулярными отпечатками) применили для селективного определения цитизина. Недавно, для получения ДНК-гидрогеля для спонтанной денатурации и сшивки ДНК был также использован реактив Хуберта [64]. Не

исключено, что подобные полимерные носители могут иметь интерес для ДНК-аффинной хроматографии [19].

Таблица 5. Характеристика гелей, активированных ДГЭЭГ

Параметры/ Тип лиганда	Структура лиганда	Ёмкость ААФТ по белку, мг/мл
1. Гидразид йодантраниловой кислоты		0.05
2. Ванилингидразон салициловой кислоты		0.08
3. Фтивазид		0.13
4. Ванилингидразон йодантраниловой кислоты		0.19

Для выделения из водных растворов ряда кислых красителей типа Red37 (AR37) и Blue25 (AB25) применили ДГЭЭД-модифицированный хитозан [65]. Указывается использование [66,67] реактива Хуберта как кросс-сшивающего агента для альбумина. Интересно, что сшитые реактивом Хуберта альбумины после дополнительной химической модификации различными функциональными группами могут служить основой для конструирования новых хиральных адсорбентов, которые используются в так называемой обращенной аффинной хроматографии [2].

Полиаллиламина гидрохлорид – карциноантиген, использованный для получения импритинг-гидрогеля с помощью ДГЭЭД [68], для селективного связывания карцином-эмбрионов антигенов, нашедших практическое значение в терапии и диагностике.

Для получения нерастворимого альбумина японские исследователи в качестве кросс-реакта использовали 215 мМ раствор ДГЭЭД. Реакция проводилась в течение суток при комнатной температуре [69]. Авторы отмечают активное связывание полученного препарата с группой азокрасителей, среди которых 2-[4-гидроксифенилазо] бензойная кислота.

Новые дозирующие лекарства гелевого типа на основе желатина и хитозана для лечения глаукомы получены в работе [70] португальских ученых. В ней исследована серия кросс-сшивающих реагентов, в том числе реактивы Сандберга-Пората (диглицидиловый эфир 1,4-бутандиола) и Хуберта (диглицидиловый эфир 1,2-этандиола). Показано, что наилучшими свойствами обладают препараты на основе бисэпоксидов. По данным работы [71] ДГЭЭД использовали и при получении ковалентных ДНК-гелей.

Производные гидроксиэтилцеллюлозы, декстрана и ряда аналогов были сшиты реактивом Хуберта и его реологические характеристики представлены в работе [72].

Недавно, в работе [73] для получения кросс-сшитого лекарственного препарата хондроитин сульфата была использована полимерная форма реактива Хуберта (препарат EX-810). Для изучения процессов связывания перешитых образцов использовали бычий сывороточный альбумин, а также диклофенак.

В работе [74] получен гидрогель на основе хитозана, химически модифицированного пировиноградной кислотой и перешитого реактивом Хуберта. Микросенсор для определения ряда оксидаз и пироксидаз на основе углеродного электрода получен через реактив Хуберта в работе [75].

Новый кальций хондроитин сульфатный носитель, синтезированный через полимерную форму реактива Хуберта (EX-810), изучали в работе [76] в качестве специфического переносчика лекарств.

В работе [77] поливиниловый эфир, перешитый ДГЭЭД использовали для изучения феномена взаимодействия с лекарствами (ванкомицина гидрохлорид и др.).

Новые биodeградебельные гидрогели [78] на основе перешивки реактивом Хуберта амилопектина и модифицированные остатками комплексона изучали в процессах связывания Cu^{+2} -ионов, фактически реализуя феномен металл-хелатной хроматографии.

В работе [79] описано применение новых консервантов биоматериалов: эпоксидов Денакол EX-313(полиглицидиловый эфир глицерола) и Денакол EX-810 (диглицидиловый эфир этиленгликоля).

Таким образом приведенные данные подчеркивают использование реагента Хуберта для феномена эпоксиактивации ряда матриц, как мягкой, так и жесткой природы. Однако начиная примерно с начала 2000-х гг. реагент Хуберта начинает активно имиджироваться как мощный стабильный кросс-сшивающий агент для конструирования полимерных матриц с разнообразными функциональными феноменами применения.

Заключение

В заключение отметим, что будущие перспективы применения новейших эпоксиадсорбентов для методов КАФХ и НАФХ, в целом, должны быть связаны с использованием «чистых» R-, или S-измеров (R-эпоксикарбинол и его аналоги), полученных через реакцию Шарплесса. Понятно, что использование таких хиральных эпоксиреагентов открывает новые горизонты в АФХ биополимеров, НАФХ.

Именно эта проблема – выделение, разделение и анализ R-, S-активных изомеров лекарственных веществ была ключевой на Международном фармацевтическом форуме в Италии [80]. Отметим также, что эпоксиактивированные носители (на основе ДГЭЭД) весьма интересны в лигандообменной хроматографии [2], как химически модифицированные аналоги универсального (по сорбции) геля сефадекс LH-20 [58,81]. В целом, следует подчеркнуть, что реагент Хуберта существенно расширяет возможности конструирования ААфТ по принципу АфС.

Список сокращений

ААфТ	адсорбент аффинного типа
ЭХГ	эпихлоргидрин
ДГЭЭД	диглицидиловый эфир 1,2-этандиола
АфС	аффинный синтез
ВАЖХ	высокоэффективная аффинная жидкостная зроматография
АфХ	аффинная хроматография
НАФХ	неклассическая аффинная хроматография
МФК	межфазный катализатор
РАС	реакция азосочетания
БЭП	бис-эпоксид
пНБГ	пара-нитро-бензгидразид
ГСК	гидразид салициловой кислоты
ТСГ	тироксинсвязывающий глобулин

Список литературы

1. Клящицкий Б.А., Кузнецов П. В. Аффинные адсорбенты на основе носителей, активированных эпоксидными соединениями. // Успехи химии. 1984. №53. С. 1740-1763.
2. Кузнецов П.В., Эпоксиактивированные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. Кемерово.: Кузбассвузиздат. 2002. С. 104.
3. Кузнецов П.В. Современное состояние синтеза азоадсорбентов аффинного типа для исследования физиологически активных веществ. // Хим.-фарм. журн., 1993, т.27, №6, с. 36-45.
4. Поленок Е.Г., Кузнецов П.В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XIX. Синтез эпоксиадсорбентов с йодпроизводными некоторых лекарственных веществ в качестве лигандов для аффинной хроматографии белков сыворотки крови человека. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2004. №1. С.51-55.
5. Поленок Е.Г., Кузнецов П. В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XVIII. О перспективах конструирования адсорбентов с йодсодержащими и п-аминобензоатными лигандами для аффинной хроматографии белков сыворотки крови человека. // Вестник РАЕН Западно-сибирское отделение. 2002. вып. 5. С. 98-104.
6. Поленок Е. Г. Синтез и применение аффинных адсорбентов с иммобилизованными структурными аналогами гормонов для выделения белков сыворотки крови. Автореф дисс. ...канд. фарм. Наук. Томск. 2003. 19.С.
7. Поленок Е. Г., Кузнецов П. В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XX. Синтез и применение йодпроизводных фенолфталеина и тирозина в аффинной хроматографии белков сыворотки крови человека. // Хим.-фарм. журн.. 2003. № 12. С. 38-40.
8. Trofimov B.A., Nedolya N.A. A New Strategy in the Synthesis of Epoxy Resins. // Reviews on Heteroatom Chemistry. v.9. p. 205-229.
9. Трофимов Б.А., Недоля Н.А., Вялых Е.П., Рапопорот Л.Я., Тростянская И.И., Петрова Г.Н. Эпоксиацетали – производные винилглицидиловых диэфиров гликолей. // ЖОрХ. 1977. т. 13. №1. С. 46-49.

10. Недоля Н.А., Трофимов Б.А. Виниловые эфиры, содержащие эпокси группу. VII. Эпоксиацетали // ЖОрХ. 1985. т.21. №4. С. 750-755.
11. Трофимов Б.А., Недоля Н.А., Хилько М.Я., Григоренко В.И., Жумабекова М.К., Матевосян Р.О., Петров Г.Н., Вялых Е.П. Способ получения полиглицидиловых эфиров многоатомных спиртов. Авт. свидетельство № 892887. 1981
12. Трофимов Б.А., Недоля Н.А., Хилько М.Я., Станкевич В.К., Белозеров Л.Е., Вялых Е.П. Способ получения эпоксипроизводных углеводов. Авт. свидетельство № 1074881, приор. 1983. Бюлл. изобр., № 7, 1984.
13. Станкевич В.К., Белозеров Л.Е., Кухарев Б.Ф., Трофимов Б.А. Безотходная технология синтеза винилокса. // Наука производству. 2004. № 1. С. 19-20.
14. Лисичкин Г. В., Фадеев А. Ю., Сердан А. А. и др. Химия привитых поверхностных соединений. М.: Физматлит. 2003. 592 с.
15. Кузнецов П. В., Энгельман Е.В. Аффинная хроматография в XXI веке: ключевые приоритеты стратегии и тактики. // Вопросы биол. мед. и фарм. химии. 2000. №4. С. 3-9.
16. Золотов Ю.А., Варшал Г.М., Иванов В.М. Аналитическая химия металлов платиновой группы. // Журнал аналитической химии. 2004. т.59. №7. С.779-781.
17. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. Материалы с молекулярными отпечатками: синтез, свойства, применение. // Успехи химии. 2006. т.75. №10. С.998-1017.
18. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии (Под ред. Г.В. Лисичкина). М.: Химия. 1986. 248с.
19. Handbook of affinity chromatography (edit. D.S. Hage). 2006. 944 p.
20. Даванков В.А., Яшин Я.И. Сто лет хроматографии. // Вестник РАН. 2003. Т.73. №7. С. 637-646.
21. Поленок Е.Г., Кузнецов П.В., Зинчук С.Ф. Тироксинсвязывающие белки: характеристика и современные методы хроматографического выделения и очистки // Вопр. био. мед. и фарм. химии. 2010. №7. С.3-13.
22. Сухих А.С., Кузнецов П.В. Эпоксимодифицированные азoadсорбенты аффинного типа в анализе трудностандартизируемых лекарственных препаратов. Качественная характеристика препарата ФиБС. // Вестник РАЕН Западно-сибирское отделение. 2008. вып. 10. С. 48-55.
23. Кузнецов П. В., Сухих А.С., Гуров Е. А. и др. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. Изучение качества лекарственного средства ФиБС на эпоксиазoadсорбентах нового поколения. // Медицина в Кузбассе. 2005. №4. С. 97-98.
24. Сухих А.С., Кузнецов П.В. К проблеме хроматографического исследования гумата натрия (Aldrich, Германия) на перешитых полисахаридных гелях. // Вест. КузГТУ. 2006. №6. С.115-117.
25. Кузнецов П.В., Гуров Е.А., Сухих А.С. Современные перспективы применения жидкостной колоночной хроматографии в химии гуминовых веществ. // Вестник РАЕН Западно-сибирское отделение. 2007. вып. 9. С. 95-101.
26. Кузнецов П. В., Сухих А. С. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XXII. Эпоксиазoadсорбенты в очистке гуминовых веществ лечебных грязей. // Вестник РАЕН Западно-сибирское отделение. 2006. вып. 8. С. 113-117.
27. Сухих А. С., Кузнецов П. В., Зинчук С. Ф. Способы выделения, концентрирования и очистки гуминовых и гуминоподобных веществ из объектов природного происхождения (методические рекомендации). Кемерово.: Кузбассвуиздат. 2006. 29 с.

28. Гуров Е.А., Сухих А.С., Кузнецов П.В. Сравнительная характеристика гуминовых и гуминоподобных веществ методом ЯМР ^{13}C . // Труды научно-практической конференции «Фармация из века в век», ч. III. Анализ и стандартизация лекарственных средств. С.-Петербург. 2008. С. 24-29.

29. Сухих А.С., Гуров Е.А., Кузнецов П.В. Азоадсорбенты аффинного типа на основе полисахаридного геля универсального назначения // Материалы общероссийской с международным участием научной конференции, посвященной 75-летию химического факультета ТГУ. Томск. 2007. С. 258-260.

30. Сухих А.С., Кузнецов П.В. Новый тандемный хроматографический способ выделения и очистки гуминовых кислот и их аналогов из природных объектов и лекарственных препаратов. // Сборник научных трудов. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск. 2007. вып.62. С. 383-387.

31. Халахин В.В., Кузнецов П.В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ XXIV. Особенности разделения ноотропных препаратов методом неклассической аффинной хроматографии. // Вопр. био. мед. и фарм. химии. 2010. №8. С. 25-29.

32. Барбараш Л. С., Журавлева И. Ю. Новое поколение биопротезов для сердечно-сосудистой хирургии: 10-летний опыт и перспективы. // Медицина в Кузбассе. 2003. №2. С.27-31.

33. Кудрявцева Ю.А., Журавлева И.Ю., Опарина Л.А., Хилько М.Я., Трофимов Б.А., Барбараш Л.С. Применение смесей моно- и олигоэпоксидных соединений для консервации биологических протезов клапанов сердца. // Патология кровообр. и кардиохирургия. 2008. № 1. С. 79-84.

34. Кудрявцева Ю.А., Глушкова Т.В., Титова А.Т., Опарина Л.А. Влияние различных консервантов на гемосовместимость ксеногенного митрального клапана. // Материалы регион научно-практ конф с Междун. участием «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии». Кемерово. 2006. С. 215.

35. Журавлева И.Ю. Способ обработки биологических протезов для сердечно-сосудистой хирургии. // Патент России. № 2122321. 1998.

36. Журавлева И.Ю., Кудрявцева Ю.А., Трофимов Б.А. Влияние различных консервантов и иммобилизованного гепарина на тромборезистентные свойства артериальных биопротезов. // Материалы Всеросс. научно-практ. конф. по стандартизации медиц. технол., реабилитации в ангиологии и сосудистой хирургии. Новокузнецк. 2006. С. 58.

37. Hubert P., Matiz R., Dellacherie E. Polymer ligands for mild hydrophobic interaction chromatography - principles, achievements and future trends // J. Chromatogr. A. 1991. V.539. P. 297-306.

38. Tomaz C. T., Duarte D., Queiroz J.A. Comparative study on the fractionation of cellulases on some hydrophobic interaction chromatography adsorbents // J. Chromatogr. A. 2002. V.944. P. 211-216.

39. Queiroz J. A., Tomaz C. T., Cabral J.M. Hydrophobic interaction chromatography of proteins // J. Biotechnol. 2001. V.87. P. 143 -159.

40. Queiroz J. A., Garcia F.A., Cabral J.M. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polyethylene glycol immobilized on Sepharose // J. Chromatogr. A. 1996. V. 734. P. 213-219.

41. Diogo M.M., Silva S., Cabral J.M., Queiroz J. A. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilised on Sepharose // J. Chromatogr. A. 1999. V. 849. P. 413-419.

42. Rippel G., Szepezy L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on an Alkyl-Superose column // J. Chromatogr. A. 1994. V.664. P.27-32.
43. Oscarsson S., Karsans P. Salt-promoted adsorption of proteins onto amphiphilic agarose-based adsorbents: II. Effects of salt and salt concentration // J. Chromatogr. A. 1998. V.803. P.83-93.
44. Mawadza C., Hatti-Kaul R., Zvauya R., Mattiasson B. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains // J. Biotechnol. 2000. V.83. P. 177 -187.
45. Tomaz C.T., Queiroz J.A. Studies on the chromatographic fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction // J. Chromatogr. A. 1999. V.865. P. 123-128.
46. Brumbauer A., Johansson G., Részey K. Fractionation of cellulase and β -glucosidase in a *Trichoderma reesei* culture liquid by use of two-phase partitioning // Bioseparation 1999. V.7. N.6. P. 287-295.
47. Zachariou M. Affinity chromatography: methods and protocols (Methods in molecular biology) // Human Press. 2007. 343 p.
48. Кузнецов П.В., Энгельман Е. В., Поленок Е.Г. О надежности способа эпоксиактивации полимерных носителей бисэпоксидом этиленгликоля в синтезах адсорбентов аффинного типа. // Материалы всероссийской. конф. Проблемы медицины и биологии. Кемерово. 1998. С. 283.
49. Кузнецов П.В., Энгельман Е.В., Теслов Л.С. и др. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XV. Синтез азoadсорбентов нового поколения для хроматографического исследования фенольных соединений. // Хим.-фарм. журн. 2001. №10. С. 36-40.
50. Теслов Л.С., Кузнецов П.В., Энгельман Е.В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ XVII. Разделение флавоноидов и некоторых родственных соединений методом неклассической аффинной хроматографии // Раст. ресурсы, вып.4. 2001. С. 130-139.
51. Дудин А.А., Кузнецов П.В. Ванилингидразоны йодзамещенных о-амино(гидрокси)-бензойных кислот – оригинальные реагенты аффинного синтеза. // Материалы XI научно-практической конференции «Химия в XXI веке: новые технологии, новые продукты». Кемерово. 2008. С.136
52. Дудин А. А. Конструирование нового лиганда на основе йодированного гидразона антралиновой кислоты. // Медицина в Кузбассе (спецвыпуск). 2008. №2. С. 62.
53. Халахин В. В., Кузнецов П. В., Михайловский А. Г. и др. Гидразид антралиновой кислоты – новый реагент аффинного синтеза. // Материалы конференции «Актуальные вопросы фармации в XXI веке». С.-Пб. 2008. С. 164.
54. Халахин В. В., Дудин А. А., Кузнецов П. В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XXV. Новые эпоксиазoadсорбенты на основе ванилингидразонов о-(окси, амино)замещенных бензойных кислот в неклассической аффинной хроматографии. // Ползуновский вестник. 2008. №3. С. 190-193.
55. Халахин В. В., Кузнецов П. В. К проблеме изучения препаратов, содержащих экстракт Гинкго билоба методом неклассической аффинной хроматографии. // Сборник тез. докл. «Химия в XXI веке: новые технологии, новые продукты». Кемерово. 2007. С. 160-161.
56. Халахин В. В., Кузнецов П. В. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XXIII. Скрининг модельных смесей ноотропных препаратов на азоепоксиадсорбентах нового поколения. //

Сборник научных трудов. «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск. 2007. вып.62. С. 405-407.

57. Сухих А.С., Коршунов А.В., Кузнецов П.В. Синтез эпоксиазадсорбента аффинного типа для выделения и очистки биологически активных веществ Звездчатки средней (*Stellaria media* (L.)). // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». Пятигорск. 2008. вып. 63. С. 339-341.

58. Кузнецов П.В., Федорова Ю.С. Полимерные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. XXVIII. К феномену хроматографического разделения фитопрепаратов Копеечника забытого на сефадексе LH-20 и его химически модифицированном аналоге. // Ползуновский вестник. 2009. №3. С. 338-340.

59. Кузнецов П.В., Гуров Е.А., Сухих А.С. Современные перспективы применения жидкостной колоночной хроматографии в химии гуминовых веществ. // Вестник РАЕН ЗСО. 2007. вып.9. С. 95-101.

60. Плетнева Т.В., Сыроешкин А.В., Попов П.И. и др., Итоги 15-го международного симпозиума "Фармацевтический и биомедицинский анализ". // Хим.-фарм. журн. 2005. №8.

61. Хенке Х. Жидкостная хроматография. М.: Техносфера. 2009. 264с.

62. Sandhu A, Handa H, Abe M. Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics. // *Nanotechnology*, 2010, Nov 5;21(44):442001

63. Kamari A, Pulford I.D., Hargreaves J.S. Chitosan as a potential amendment to remediate metal contaminated soil - a characterisation study. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 82(1):71-80.

64. Gao B, Li Y, Zhang Z. Preparation and recognition performance of creatinine-imprinted material prepared with novel surface-imprinting technique. // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 878(23):2077-86.

65. Gao B, Niu Q, Du R. Preparation and recognition performance of cytosine alkaloid-imprinted material prepared using novel surface molecular imprinting technique. // *J Sep Sci*. 2010;33(9):1338-48.

66. Topuz F, Okay O. Formation of hydrogels by simultaneous denaturation and cross-linking of DNA. // *Biomacromolecules*. 2009;10(9):2652-61.

67. Azlan K, Wan Saime WN, Lai Ken L. Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption. // *J Environ Sci (China)*. 2009; 21(3):296-302.

68. Yamazoe H, Tanabe T. Cell micropatterning on an albumin-based substrate using an inkjet printing technique. // *J Biomed Mater Res A*. 2009;91(4):1202-9.

69. Yamazoe H, Uemura T, Tanabe T. Facile cell patterning on an albumin-coated surface. // *Langmuir*. 2008;24(16):8402-4.

70. Casey B.J., Kofinas P. Selective binding of carcinoembryonic antigen using imprinted polymeric hydrogels. // *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(2):359-63.

71. Yamazoe H, Tanabe T. Preparation of water-insoluble albumin film possessing nonadherent surface for cells and ligand binding ability. // *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(1):228-34.

72. Almeida J.F., Fonseca A., Baptista C.M., Leite E., Gil M.H. Immobilization of drugs for glaucoma treatment. // *J. Mater Sci Mater Med*. 2007;18(12):2309-17.

73. Costa D, Miguel MG, Lindman B. Effect of additives on swelling of covalent DNA gels. // *J Phys Chem B*. 2007; 111(29):8444-52.

74. Silioc C, Maleki A, Zhu K, Kjøniksen AL, Nyström B. Effect of hydrophobic modification on rheological and swelling features during chemical gelation of aqueous polysaccharides. // *Biomacromolecules*. 2007;8(2):719-28.

75. Wang S.C., Chen B.H., Wang L.F., Chen J.S. Characterization of chondroitin sulfate and its interpenetrating polymer network hydrogels for sustained-drug release. // *Int J Pharm*. 2007 Feb 1;329(1-2):103-9.

76. Sun J, Chen J, Yang L, Wang S, Li Z, Wu H. Synthesis and characterization of a pH-sensitive hydrogel made of pyruvic-acid-modified chitosan. // *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(1):35-44.

77. Oldenzien W.H., Dijkstra G., Cremers T.I., Westerink B.H. Evaluation of hydrogel-coated glutamate microsensors. // *Anal Chem*. 2006;78(10):3366-78.

78. Tsai MF, Chiang YL, Wang LF, Huang GW, Wu PC. Oral sustained delivery of diclofenac sodium using calcium chondroitin sulfate matrix. // *J Biomater Sci Polym Ed*. 2005;16(10):1319-31.

79. Orienti I, Treré R., Luppi B., Bigucci F., Cerchiara T., Zuccari G., Zecchi V. Hydrogels formed by crosslinked poly(vinyl alcohol) as sustained drug delivery systems. // *Arch Pharm (Weinheim)*. 2002;335(2-3):89-93.

80. Плетнева Т.В., Сыроешкин А.В., Попов П.И. и др., Итоги 15-го международного симпозиума "Фармацевтический и биомедицинский анализ". // *Хим.-фарм. журн*. 2005. №8.

81. Хенке Х. Жидкостная хроматография. М.: Техносфера. 2009. 264с.

Дудин Андрей Александрович – ассистент кафедры фармакогнозии и ботаники Кемеровской государственной медицинской академии, Кемерово

Кузнецов Пётр Васильевич – д.фарм.н., проф., зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ГОУ ВПО Кем ГМА, Кемерово

Поленок Елена Геннадьевна – к.фарм.н., зав. лаборатории иммунобиотехнологии института экологии человека СО РАН, Кемерово

Халахин Виталий Владимирович – ассистент кафедры управления и экономики фармации ГОУ ВПО Кем ГМА, Кемерово

Сухих Андрей Сергеевич – к.фарм.н., ст.научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ГОУ ВПО Кем ГМА, Кемерово

Dudin Andrey A. - assistant of the department of pharmacognosy and botany state medical academy, Kemerovo, e-mail: dudin2984@mail.ru

Kuznetsov Petr V. – The doctor of pharmaceutical sciences, professor, manager by the department of pharmaceutical and toxicological chemistry state medical academy, Kemerovo

Polenok Elena G. – The candidate of pharmaceutical sciences, manager by a laboratory of immunobiotechnology institute of ecology of man of the Siberian separation of the Russian academy of sciences, Kemerovo

Halahin Vitaly V. - Assistant of the Department of Management and Economics of Pharmacy state medical academy, Kemerovo

Sukhikh Andrey S. – The candidate of pharmaceutical sciences, the senior scientific employee of central scientifically research laboratory state medical academy, Kemerovo