

TECHNIQUES OF CHEMISTRY

# THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Second Edition

by

**J. G. KIRCHNER, Retired**

Senior Scientist

The Coca-Cola Company

Edmond S. Perry, Editor

A Wiley-Interscience Publication

John Wiley & Sons

New York • Chichester • Brisbane • Toronto

**Ю. Кирхнер**

# ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

**2** В ДВУХ ТОМАХ

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО

канд. техн. наук А. Ю. КОШЕВНИКА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

доктора хим. наук, проф. В. Г. БЕРЕЗКИНА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» • МОСКВА 1981

Автор книги — один из первых американских ученых-практиков в области тонкослойной хроматографии (ТСХ) — важного и перспективного метода разделения и анализа самых сложных химических систем. В книге дано описание аппаратуры и техники применения тонкослойной хроматографии и развернутый перечень систем, где метод может быть использован в аналитических целях.

Во втором томе рассматривается практическое применение ТСХ.

Предназначена для работников научно-исследовательских институтов и заводских лабораторий, для преподавателей и студентов химических, биологических, медицинских специальностей.

*Редакция литературы по химии*

1805000000

К 20503—072 72—81, ч. 1  
041(01)—81

© 1978 by John Wiley & Sons, Inc.  
All rights reserved. Authorized  
translation from English language  
edition published by John Wiley  
& Sons, Inc.

© Перевод на русский язык, «Мир»,  
1981.

### 1. ПИЩЕВЫЕ КРАСИТЕЛИ, РАСТВОРИМЫЕ В ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ

#### Адсорбционная хроматография

Вещества этой группы входят в число соединений, которые анализировались хроматографически на пластинках с незакрепленным слоем. Моттье и Поттерат применяли как круговую [1], так и восходящую [2] хроматографию с незакрепленными слоями оксида алюминия для разделения некоторых синтетических и природных пищевых красителей. Лагони и Уортман [3—5] разделили методом круговой хроматографии на незакрепленных слоях оксида алюминия следующие жирорастворимые пищевые красители: диметиламиноазобензол, биксин,  $\beta$ -каротин, витамин А, мартинус желтый, церес оранжевый GN, церес оранжевый R, церес красный BB, церес красный G и церес желтый 3G.

Для того чтобы обнаружить эти красители в пищевых продуктах, прежде всего необходимо выделить их; Яничек и др. [6] описали способ их выделения из животного масла. 10 г масла нагревают 30 мин на водяной бане с 100 мл 10%-ного этанольного раствора гидроксида калия. Далее к раствору добавляют 100 мл дистиллированной воды и дают остыть до комнатной температуры. После этого краситель экстрагируют 4 раза порциями по 50 мл гексана. Гексановые экстракты объединяют, дважды промывают 100 мл воды и сушат над сульфатом натрия. Затем гексан отгоняют, а остаток растворяют в небольшом количестве бензола и полученный раствор наносят на тонкослойные пластинки. Разделение проводят на незакрепленном слое оксида алюминия, растворителем служит смесь петролейного эфира и четыреххлористого углерода (1:1). Эти же авторы опубликовали величины  $R_f$ , полученные для указанных красителей с 12 различными растворителями [7].

Рейнерс [8] смешивал 5 г окрашенного жира или масла с 1 г активированного гидроксида железа(II) и добавлял легкий петролейный эфир до образования кашицы. Эту кашицу он фильтровал через стеклянный фильтр и промывал петролейным эфиром, чтобы удалить из нее жир, далее растворял гидроксид железа теплой 18 %-ной соляной кислотой и экстрагировал эфиром краситель. Полученный экстракт Рейнерс промывал, концентрировал и хроматографировал на слое кизельгур G—0,5 н. раствор шавелевой кислоты (2:5) с применением гексана или петролейного эфира (50—70 °C) в качестве растворителя. В работе [8] даны величины  $R_f$  22 жирорастворимых красителей.

Монтаг [9] описал методику разделения на слоях силикагеля G таких красителей, как мартиус желтый, диметиламиноазобензол, церес желтый, церес оранжевый, судановый красный, церес красный ВВ и индофенол. Исходный жир растворяли в петролейном эфире и хроматографировали на колонке с оксидом алюминия, чтобы удалить собственно жир и получить концентрат красителей, который далее элюировали спиртом и разделяли на тонкослойных пластинках.

Фуджи и Камикура [10] изучали разделение на силикагеле 15 красителей, растворимых в органических средах, используя 12 различных растворителей. Они установили, что, применяя 1,2-дихлорэтан, можно разделить азобензол, *n*-аминоазобензол, масляный желтый, *n*-метоксиазобензол, *n*-оксиазобензол и судановый G. С помощью ксилола или пентахлорэтана удалось разделить масляный желтый АВ и масляный желтый ОВ. Для разделения красителей судановый III, судановый IV и масляный красный OS можно применять в качестве растворителей дихлорэтан, хлороформ или 1,1,2-трихлорэтан.

Копиус-Пееребоом [11] хроматографировал на силикагеле G, оксиде алюминия G и кизельгуре G 12 красителей и некоторых природных красящих веществ, применяя 6 различных растворителей.

Для разделения разрешенных к употреблению в Великобритании 26 пищевых красителей, получаемых из каменноугольной смолы, применяли электрофорез [12]. Результаты, полученные в шести различных растворах электролитов на бумаге, кизельгуре, силикагеле и оксиде алюминия, приведены в виде таблиц.

Разделению растворимых в органических средах красителей посвящен ряд работ. Циаска и Казинови [13] привели  $R_f$  15 красителей, полученных на силикагеле с двумя различными растворителями; Барретт и Райян [14] описали разделение 16 нерастворимых в воде красителей на силикагеле с пятью различными растворителями; Канути и Маграсси [15] анализировали смесь 14 красителей, разрешенных к употреблению в Италии; Сиодинос и др. [16] разделяли на слоях карбоната кальция краси-

тели, разрешенные к употреблению в Греции; авторы работы [17] описали методику разделения красителей на предметных стеклах микроскопа. Величины  $R_f$  ряда красителей, растворимых в органических средах, даны в табл. 21.1.

Уолленуэбер [18] разделял красители на тонких закрепленных (с алебастром в качестве связующего) и незакрепленных слоях целлюлозы. Слои, приготовленные из порошка целлюлозы MN 300 или MN 300 G, просушивали 10 мин при 105 °C. Для разделения применяли три смеси: 2,5 %-ный раствор цитрата натрия—25 %-ный гидроксид аммония (4:1), *n*-пропанол—этилацетат—вода (6:1:3) и *трет*-бутанол—пропионовая кислота—вода (50:12:38), причем последняя содержала еще добавку 0,4 % хлорида калия. Сало и Салминен [19] применили этот метод для разделения ряда пищевых красящих веществ, разрешенных к употреблению в Финляндии. Их результаты, а также некоторые величины  $R_f$ , полученные при разделении на силикагеле [13], приведены в табл. 21.2. (Следует напомнить, что в разных странах действуют различные законы об использовании веществ в пищевых продуктах и что эти законы непрерывно меняются, поэтому то, что разрешено сегодня к употреблению в данной стране, может быть не разрешено завтра.)

Рэй [20] хроматографировал на пластинках с силикагелем G 21 жирорастворимый краситель, применяя в качестве растворителей бензол, ксилол, смеси петролейный эфир (40—60 °C) — ацетон (9:1) и петролейный эфир (40—60 °C) — хлороформ (3:1). Полученные величины  $R_f$  приведены в его работе.

Копиус-Пееребоом и Бикс [21] анализировали 19 растворимых в органических средах красителей, используя различные хроматографические системы: 1) полиамид со смесями хлороформ—метанол—вода (5:15:1), ацетон—этанол—вода (6:3:1), метанол—ацетон—уксусная кислота (6:2:2) и петролейный эфир (80—100 °C)—бензол—уксусная кислота (75:25:0,5); 2) силикагель с хлороформом, смесями гексан—этилацетат (9:1), петролейный эфир—аммиак—диэтиловый эфир (7:1:3) и с трихлорэтиленом (4-кратное элюирование); 3) кизельгур G с циклогексаном; 4) оксид алюминия G со смесью гексан—этилацетат (49:1) и 5) силикагель G, пропитанный раствором нитрата серебра, со смесями хлороформ—петролейный эфир—уксусная кислота (75:25:0,5), хлороформ—тетрахлорид углерода—уксусная кислота (80:20:0,2), бензол—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90:10:0,1). В указанной работе даны  $R_f$  следующих красителей: судановый I, II и III, биксин, мартиус желтый, хлорофилл,  $\alpha$ -каротин, масляный желтый, церес красный G, церес оранжевый GN, церес желтый 3G, масляный желтый XP, желтый ОВ, желтый АВ, оранжевый SS и 8'-апо- $\beta$ -каротинал.

Таблица 21.1

Величины  $R_f \times 100$  некоргох красителей, растворимых в органических средах

Краситель	Цветной индекс <sup>а</sup>	Смлякагель б [10]				Смлякагель G [11]			Оксид алюминия [11]	Кисель-гур [11]	
		1,2-ди-хлоретан	ксилол	пента-хлоретан	хлоро-форм	1,1,2-три-хлоретан	гексан-этилацетат (9:1)	петролей-ный эфир-ук-сусная кислота (70:30:1)			петролей-ный эфир-аммиак (70:30:1)
Мартиус желтый	10315	64	63	45	88	65	0	28	0	0	0
Азобензол	11000	28	6	3	37	18	68	68	57	59	85
Желтый растворитель	11020	49	27	10	70	47	55	55	41	22	88
п-Метоксиназобензол	11380	54	40	22	70	55	64	64	49	27	87
Желтый АВ	11390	62	50	34	82	64	25	46	41	22	88
Желтый ОВ	11800	12	4	1	11	8	27	50	49	27	87
Желтый растворитель 7	12055	42	23	16	64	41	68	77	70	56	63
Сулановый I	12700						54	74	75	56	54
Церес желтый	12740						60	81	80	68	40
Желтый ХР	47007	3	0	0	18	5	14	36	37	0	0
Хинолиновый желтый SS	11920	5	2	0	5	4					
Сулановый G	12100	42	20	16	64	41	72	78	67	62	44
Масляный оранжевый SS	12140	42	20	16	64	41	18	30	36	19	16
Сулановый II	12150						56	68	61	41	15
Церес красный G	2610	41	140	7	59	34	56	68	61	41	15
Сулановый III	2610	42	145	10	63	38	56	68	61	38	15
Сулановый IV	26125	35	10	7	58	34					
Масляный красный OS											

<sup>а</sup> Цветной индекс «Общества красильщиков и колористов», Бредфорд, 1956.<sup>б</sup> Длина пути разделения 10 см.Таблица 21.2  
Величины  $R_f \times 100$  некоргох красителей, растворимых в органических средах, полученные на порошках целлюлозы и на смлякагеле

Краситель	Цветной индекс <sup>а</sup>	Целлюлоза MN300 [19]		Смлякагель [13]		Целлюлоза MN300 G [18]	
		2 % цитрата натрия в 5 %-ном ам-миаке	трет-бутанол-пропионовая кислота-вода (50:12:38) с 0,4 % KCl	М-бутанол-этанол-вода (20:20:5)	М-бутанол-этанол-вода (20:20:5:1)	пропанол-этилацетат-вода (50:12:38)	трет-бутанол-пропионовая кислота-вода (50:12:38) с 0,4 % KCl
Новый синий	42045	68	76	0	0	0	0
Индантреновый синий RS	69800	0	0	0	0-3	22	11
Индго карминовый	73015	18	11				
Гвинейский зеленый	42085	17	73				
Патент зеленый	42053	86	62	51	46	51	45
Стойкий желтый	13105	58	42	(13-33) <sup>б</sup>	4	20	10
Тартразиновый	19140	70	9	65	64	60	78
Хризоидиновый	14270			68	56	33	18
Хинолиновый желтый	47005			68	28	54	51
Оранжевый GGN	15980	47	43	(51)	(0-28)	52	48
Оранжевый S	15985	45	41		24-36	56	63
Азорубиновый красный № 2	14720	19	49			55	56
Нафтоловый красный	16045	25	44			15	7
Амарантовый	16185	42	5	17	0	15	7
Пунцовый 4R	16255	65	20	37	12	28	23
Эритрозининовый	45430	5	86			(74)	100
Пунцовый SX	14700	37	43				
Алый GN	14815	81	59	55	0	10	2
Бриллиантовый черный	28440	13	1	(0)	(0)		
Кислотный фиолетовый	42640	10	73				
Фиолетовый	42650	17	71				

<sup>а</sup> Цветной индекс «Общества красильщиков и колористов», Бредфорд, 1956.<sup>б</sup> Скобки означают образование прожилков. Следует отметить, что некоторые красители содержат примеси, проявляющиеся в виде маленьких пятен. В таблицу включены только данные, полученные на основных пятнах.

### Количественное определение красителей, растворимых в органических средах

Давидек и др. [6, 7] определяли спектрофотометрически количество красителя после элюирования его с тонкослойной пластинки. С этой целью пятно соскребают в воронку со стеклянным фильтром и элюируют 8 мл бензола, после этого доводят объем раствора до 10 мл и измеряют в спектрофотометре его поглощение. Весь этот анализ, начиная с экстракции красителя из пищевого продукта и кончая спектрофотометрическим определением, можно выполнить за 2 ч; если же этот анализ проводят методом хроматографии на бумаге, то только разделение компонентов пробы длится 6—10 ч. Для ряда однотипных измерений погрешность составляет от  $\pm 1,3$  до  $\pm 4,0$  %. Как уже говорилось выше (т. 1, гл. XI, разд. 2), Фродима и др. [22] применили для определения содержания красителей метод отражательной спектроскопии. Брейн и др. [23, 24] использовали для оценки количеств некоторых пищевых красителей прямой денситометрический метод. Они указали, что в образцах, полученных из различных источников, значительно меняется содержание примесей и что поэтому исследуемые образцы необходимо сравнивать с эталонами, содержащими известные концентрации красителей.

### Хроматография с обращенными фазами

Давидек и Яничек [25] использовали метод хроматографии с обращенными фазами, нанося парафиновое масло на слой крахмала. Такие адсорбционные слои получают, добавляя 10 г крахмала к 10 %-ному раствору парафинового масла в петролейном эфире таким образом, чтобы образовалась суспензия, которую легко было бы размазать по пластинке. Элюентами обычно служат 50 %-, 70 %- и 100 %-ный метанол, а также смеси метанола, воды и ледяной уксусной кислоты (16:3:1 и 8:1:1). Наилучшие результаты получены именно с этими смесями; они легко разделяют многокомпонентные смеси красителей (табл. 21.3).

Рамамерти и Бхалерао [26] провели разделение ряда жирорастворимых пищевых красителей на слоях карбоната кальция, закрепленного крахмалом и пропитанного жидким парафином, элюируя пробу смесью метанол—вода—аммиак (20:5:1). Худлес и др. [27] пропитывали слои микрокристаллической целлюлозы 10 %-раствором жидкого парафина в петролейном эфире (80—100 °С). После испарения петролейного эфира пробу элюировали смесью 2-метоксиэтанол—метанол—вода (11:3:6); таким способом удалось разделить 10 жирорастворимых красителей.

Таблица 21.3

Величины  $R_f \times 100$  растворимых в органических средах красителей, разделенных методом хроматографии с обращенными фазами на слоях крахмала, пропитанного парафиновым маслом [25]<sup>a</sup>

Краситель	50 %-ный метанол	70 %-ный метанол	100 %-ный метанол	Метанол—вода—ледяная уксусная кислота (16:3:1)	Метанол—вода—ледяная уксусная кислота (8:1:1)
Желтый OB	4	29	59	57	61
Желтый AB	6	43	61	71	71
Оранжевый SS	1	8	41	29	38
Масляный красный OS	0	0	10	3	4
Судановый I	2	11	40	36	41
Судановый II	1	4	32	19	28
Судановый III	0	3	27	10	24
Судановый IV	0	2	18	4	10
Судановый красный G	4	26	54	53	58
Судановый желтый 3G	2	14	48	33	48
Масляный желтый	4	23	57	59	66
Судановый GN		48	63	64	74
		75	95	94	98

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

растворимых красителей. Пропитанный силикагель G не дает такого же хорошего разделения, а пропитанные оксид алюминия или кизельгур обычно вызывают выцветание красок.

### 2. ПИЩЕВЫЕ ВОДОРАСТВОРИМЫЕ КРАСИТЕЛИ

Мотье и Поттерат [28—30] разработали методику отделения красителей этого типа от многочисленных водорастворимых веществ, находящихся в пищевых продуктах. Водный раствор образца продукта смешивают с равным объемом буферного раствора с pH 3 и затем экстрагируют 10—20 мл хинолина. После встряхивания смеси, производимого для ускорения экстракции красителя, хинолин отделяют центрифугированием; если необходимо, экстракцию хинолином можно повторить. Затем красители извлекают из раствора в хинолине, экстрагируя эфиром после добавления небольшого количества воды. Раствор в эфире можно хроматографировать на пластинках

с незакрепленным слоем оксида алюминия. Поскольку буферный раствор в ходе экстракции переводит красители в свободные кислоты, то пятно образца покрывают каплей 1 н. раствора щелочи и нагревают до 104°C, чтобы превратить красители в соли [30]. В качестве растворителей при хроматографическом разделении служат смеси вода—этанол—*n*-бутанол (от 1:1:9 до 1:1:1). Как правило, для разделения красителей достаточно однократного элюирования, хотя в более сложных случаях можно провести и многократное элюирование. Авторы работ [28—30] исследовали 50 водорастворимых красителей.

Разработаны и другие методы выделения красителей из пищевых продуктов и лекарственных препаратов. Так, например, образец кипятят вместе с волокнами шерсти в кислотном растворе, при этом краситель закрепляется на шерсти [31]. Далее шерсть отделяют, промывают и элюируют краситель раствором аммиака. При использовании этого метода краситель может вступать в реакции, и его извлечение может не быть количественным. Давидек [32, 33] адсорбировал краситель из водного раствора на полиамидный порошок. Сахара, гликоли, органические кислоты, этанол не препятствуют адсорбции красителей, а большинство природных антоцианов не адсорбируется. Адсорбированные антоцианы можно удалить промывкой 10 %-ным раствором уксусной кислоты в метаноле, проводимой до элюирования смесью метанола и 25 %-ного аммиака (19:1). Леман и др. [34] описали свою модификацию этой методики в применении к различным пищевым продуктам. Джилхулей и др. [35] провели дальнейшее усовершенствование методики, с тем чтобы ее можно было использовать для количественных определений. Пищевые продукты были разделены на три группы, и к каждой из групп был применен свой метод обработки. Образцы таких продуктов, как джемы, желе и конфеты, которые полностью растворимы в воде, растворяли, нагревая 5 г продукта в 50 мл воды. Полученный раствор пропускали через заполненную полиамидом колонку (15×20 мм), после чего через колонку пропускали шесть порций воды по 10 мл и три порции ацетона по 5 мл. Красители элюировали минимальным объемом смеси ацетон—вода—аммиак (уд. масса 0,88) (40:9:1). Аммиак удаляли током воздуха, причем объем раствора уменьшали вдвое, а затем опять доводили до первоначальной величины и подкисляли раствор соляной кислотой до pH 5—6. Подкисленный раствор вновь пропускали через заполненную полиамидом колонку (10×20 мм) и промывали 5 порциями горячей воды по 5 мл каждая. Далее элюировали красители ацетон-аммиачным раствором, выпаривали элюат почти досуха, остаток растворяли в нескольких каплях 0,1 н. соляной кислоты и затем подвергали тонкослойному хроматографированию. Если в исследуемом об-

разце предполагается наличие эритрозинового красителя, то остаток растворяют в воде. Хлебобулочные изделия анализируют следующим образом. Образец (5 г) измельчают, сушат 30 мин при 100°C и трижды экстрагируют петролевым эфиром (40—60°C) порциями по 30 мл. Экстрагирование ведут при перемешивании, растворитель удаляют декантацией. Остаток измельчают до грубодисперсного порошка, смешивают с 4 г целита и вводят в хроматографическую колонку. Затем через колонку пропускают 30 мл ацетона и, после того как вся колонка будет смочена, прилагают небольшое давление. Ацетоновый элюат отбрасывают и проводят элюирование 50 мл смеси метанол—вода—гидроксид тетраметиламмония (40:9:1). Элюат подкисляют разбавленной соляной кислотой до pH 6, добавляют 5 мл 1 %-ного раствора моноолеата сорбитана полиоксиэтилена и на паровой бане упаривают до половины первоначального объема. Потом раствор разбавляют до первоначального объема, охлаждают и наносят на колонку (10×20 мм), заполненную полиамидом (поверх полиамида, чтобы предохранить его от порчи, наносят слой песка толщиной 6 мм). Колонку промывают 3 раза ацетоном порциями по 5 мл, смесью хлороформ—абсолютный этанол—вода—муравьиная кислота (100:90:10:1) порциями по 5 мл, еще три раза ацетоном порциями по 5 мл и наконец три раза водой порциями по 10 мл. Красители элюируют минимальным количеством ацетон-аммиачного раствора по методу, описанному выше.

Если анализируются консервированное мясо или колбасные продукты, 25 г измельченного продукта смешивают сначала с 5 г песка, промытого кислотой, затем с 10 г целита и проводят 2-часовую экстракцию хлороформом в аппарате Сокслета. Растворитель отгоняют, остаток измельчают в порошок, вводят в колонку (22×300 мм) и элюируют смесью метанол—вода—аммиак (уд. масса 0,88), пока не выделится весь краситель. К элюату добавляют 5 мл 1 %-ного раствора моноолеата сорбитана полиоксиэтилена и упаривают раствор на паровой бане в токе воздуха, пока из него полностью не удаляется аммиак и метанол. Остаток разбавляют равным объемом воды, подкисляют соляной кислотой до pH 6 и наносят на хроматографическую колонку (15×20 мм), заполненную полиамидом, и элюируют последовательно водой (3×10 мл), ацетоном (2×5 мл), хлороформом (2×5 мл), смесью хлороформ—абсолютный этанол—вода—муравьиная кислота (100:90:10:1) (2×5 мл) и ацетоном (2×5 мл). Элюирование и концентрирование проводят так же, как при анализе джемов и желе.

Такешита и др. [36] выделили водорастворимые кислые красители из пищевых продуктов, смешивая соответствующим образом приготовленный образец с DEAE-сефадексом (ацетатная

форма) в воде. Содержащий адсорбированный краситель сефадекс промывают и элюируют краситель смесью 2 н. соляная (или серная) кислота—изопропанол (1:1). Кислый элюат нейтрализуют смесью 4 н. раствора аммиака и изопропанола (1:1) и затем непосредственно хроматографируют на полиамидном слое, чтобы разделить красители. Наилучшим растворителем для разделения при длине пути элюирования 8 см оказалась смесь пиридин—метанол—28 %-ный водный раствор аммиака—вода (5:6:1:16). Этот способ разделения позволяет исключить стадии концентрирования, предусмотренные описанными выше методами.

Элери и др. [37] выделяли красители, находящиеся в воспринимаящих веществах для лекарственных соединений, растворяя капсулу в воде и осаждая сахарозу и желатин метанолом. Полученный раствор выпаривали досуха и экстрагировали остаток метанолом, чтобы удалить оставшийся сахар. Логар и Перпар [38] механически снимали покрытие с таблеток перед растворением их в 50 %-ном этаноле, содержащем адсорбент—шерсть.

Хейс и др. [39] нашли  $R_f$  14 красителей для 24 комбинаций растворитель—адсорбент. Давидек и Давидкова [40] привели таблицу величин  $R_f$  10 красителей для 11 комбинаций аммиак—метанол—вода на полиамидных слоях и показали, что на величину  $R_f$  влияют концентрации аммиака и метанола. Массар и Де Клерк [41], пользуясь величинами  $R_f$  красителей, иллюстрировали применение математических методов для подбора оптимальных сочетаний растворителей для ТСХ. В работе Тевари и др. [42] даны  $R_f$  компонентов, найденных в 27 красителях, применяемых в производстве алкогольных напитков, а также красителей, выделенных из 10 алкогольных напитков. Разделение эти авторы проводили на силикагеле G, элюируя пробу смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) при длине пути элюирования 15 см. В работах [43, 44] описано также разделение красителей из других алкогольных напитков.

В табл. 21.4 показаны величины  $R_f$  ряда пищевых красителей в различных хроматографических системах. В оригинальных работах [20, 46—48] приведены дополнительные величины  $R_f$ .

Худлес и др. [47] разработали методику быстрой идентификации любого из 49 красителей. Предварительная идентификация осуществляется без определения  $R_f$  красителя; авторы пользуются четырехбуквенным кодом, характеризующим положение данного красителя на хроматограмме относительно положения красителей оранжевый G и амарантовый при хроматографировании четырьмя растворителями. Таким путем ограничивается число возможных отнесений, после чего проводится

Таблица 21.4

Величины  $R_f \times 100$  некоторых пищевых красителей в различных хроматографических системах<sup>a</sup>

Краситель	Цветной индекс <sup>b</sup>	Растворитель <sup>b</sup>				
		A	B	B	Г	Д
Шоколадный коричневый FB		0	0	Прожилки		
Шоколадный коричневый HT	20285	0	0	"		
Коричневый FK		57; 73	19; 42; 58	"		
Черный PN	28440	8	15	40		
Фиолетовый BNP		20	39	70		
Индиго карминовый	73015	0	0	20		от 0 до 40
Синий VRS		15	40			
Зеленый S	44090	0	17	90		41
Желтый RY		0	4; 1			
Желтый 2G	18965	0; 56	19	90		
Тартразиновый	19140	30	15	80		17
Эозиновый	45380				55	
Желтый, цвета заходящего солнца	15985	55	38	60		35
Оранжевый G	16230	55	44	80		
Флоксинный	45410			57		
Желтый RFS		62	44; 66			
Нафтоловый желтый	10316	62	52	60		
Оранжевый RN	15970	71	70	40; 50		
Пунцовый 4R	16255	13	17	70		32
Амарантовый	16185	20	17	60	69	18
Пунцовый MX	16150	23; 73	25; 53	20	76	
Пунцовый 3R	16155	25	39	20	86	54
Бенгальская роза	45440			37		
Красный 6B	18055	33	32	40		
Красный 2G	18050	37	33	60		47
Кислотный красный	45100				64	
Красный 10B	17200	48	39	20		52
Масляный красный XO	12140				67	

Продолжение табл. 21.4

Краситель	Цветной индекс <sup>б</sup>	Растворитель <sup>в</sup>				
		А	Б	В	Г	Д
Пунцовый SX	14700	49; 73	37; 44; 54	40	74	51
Стойкий красный Е	16045	57	44	40		
Кораллин	43800				80	
Кармазин	14720	61	34	30		51
Красный FB	14780	73	53	0		
Эритрозин BS	45430	76	67	10	44	92
Родамин	45170				62	

<sup>а</sup> Нормы применения пищевых красителей в разных странах различны и могут меняться.

<sup>б</sup> Цветной индекс «Общества красильщиков и колористов», Бредфорд, 1956.

<sup>в</sup> А — бутанол—гидроксид аммония (уд. масса 0,88) (90:1), 5 см на поликарбонатной пленке [45]; Б — верхняя фаза смеси бутанол—этилметилкетон—гидроксид аммония (0,88)—вода (5:3:1:1), 12,5 см на силикагеле [46]; В — тринатрийцитрат—вода—аммиак (0,88) (масса/объем/объем), 15 см на микрокристаллической целлюлозе [47]; Г — 5 %-ный хлорид аммония—изопропанол (1,5:4), 10 см на смеси полиамида и силикагеля (7:52) [48]; Д — уксусная кислота—изобутанол—вода (2:5:2) на силикагеле G [20]

дальнейшая идентификация, предусматривающая определение величин  $R_f$  или  $R_x$ . Для каждого красителя даны величины  $R_f$  в 9 растворителях.

Тернер и Джонс хроматографировали на DEAE-целлюлозе следующие трифенилметановые пищевые красители: прочный зеленый, FCF, бриллиантовый синий FCF, зеленый S, синий VRS и патент синий V. Наилучшее разделение получено с 1 М раствором иодида аммония и 0,2 М раствором бензоата аммония.

### 3. КРАСЯЩИЕ ВЕЩЕСТВА ЧЕРНИЛ

Друдинг [49] использовал ТСХ на слоях силикагеля для разделения красящих веществ, содержащихся в различных цветных чернилах (табл. 21.5). Все исследованные образцы чернил он растворял в 95 %-ном спирте и проводил элюирование этим же растворителем. Длина пути разделения на слоях силикагеля, просушенных в течение часа при 110°C, составляла 10 см. Друдинг исследовал «смываемые» чернила Шиффера марки «Скрип». Эти чернила содержат также флуоресцентную добавку, обозначенную как RC-35. Идентификация красителей не проводилась.

Таблица 21.5

Величины  $R_f \times 100$  красящих веществ «смываемых» чернил марки «Скрип», полученные на силикагеле с 95 %-ным этанолом (длина пути элюирования 10 см) [49]<sup>а</sup>

Цвет чернил	Составная часть, цвет красящего вещества	$R_f \times 100$
Черный	RC-35 <sup>в</sup>	96
	Желтый	94
	Красный	92
	Синий	80
Синий	RC-35 <sup>в</sup>	93
	Синий	92
	Темно-синий	85
	Синий	0
Зеленый	RC-35 <sup>в</sup>	95
	Желтый	93
	Синий	78
Пурпурный <sup>б</sup>	Синий	85
	Красный	84
	Пурпурный	74
	Темно-синий	0

<sup>а</sup> С разрешения автора и Am. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Хотя сами чернила флуоресцируют при облучении их УФ-светом, в данном образце на хроматографических пластинках не было обнаружено даже следов флуоресцирующей добавки.

<sup>в</sup> RC-35 — флуоресцирующая добавка.

Перкавач и Перпар [50] также анализировали методами хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии красные, зеленые и синие чернила, причем последний метод дал более надежные результаты. Сен и Гош [51] определили  $R_f$  компонентов, содержащихся в 10 типах выпускаемых сине-черных чернил. Пужицкий и др. [52] разделили на силикагеле G смесью хлороформ—метанол—муравьиная кислота (15:10:1) цветные компоненты польских синих и сине-черных чернил. Верма и Рэй [53] нашли, что смесь *n*-бутанол—3 н. раствор уксусной кислоты—этанол (5:5:2) дает хорошее разделение и что ее



можно применять для анализа чернил всех цветов, кроме красного. Для анализа красных чернил лучше пользоваться смесью метилэтилкетон—пиридин—вода (90:5:5). Разделение красителей авторы [53] проводили на силикагеле.

В отличной статье Накамуры и Шимоды [54] описывается идентификация методом ТСХ снятых с документов проб чернил шариковых ручек. При отборе проб авторы работы пользовались иглой для подкожных инъекций и после элюирования пробы пиридином проводили разделение на микропластинках с силикагелем, применяя в качестве растворителя смесь *n*-бутанол—этанол—вода (10:2:3). В работе [54] приведены величины  $R_f$  большого числа красителей, вводимых в состав чернил, а также, чтобы легче было идентифицировать эти красители, указано расположение пятен в ряде опытов.

Рейнерс [55] проводил хроматографирование чернил для шариковых ручек на слоях кизельгура G со смесью ацетон—толуол (9:1), а ван Дессель и ван Регенмортель [56] анализировали синие чернила для шариковых ручек на слоях силикагеля, элюируя пробу смесью пропанол—толуол (7:3).

Смолдон [57] наносил на маленькие кусочки бумаги чернилами прямые черточки длиной по 2 мм и помещал эти кусочки бумаги лицевой стороной вниз на слой силикагеля G размером 4×9 см. Чтобы бумага держалась на месте, он накрывал ее другой гладкой стеклянной пластинкой и проводил разделение смесью изоамиловый спирт—ацетон—вода—аммиак (50:50:30:0,04). Вполне приемлем также второй растворитель—смесь *n*-бутанол—3 н. раствор уксусной кислоты—этанол (5:5:2). Отличные результаты получены при исследовании многих типов синих чернил с использованием первого растворителя в сочетании со щелочным силикагелем. Ретти и Гейнес [58] получили хорошие результаты, особенно для синих чернил, используя силикагель и смесь *n*-бутанол—этанол—вода—уксусная кислота (12:4:4:0,1).

Келли и Канту [59] предложили стандартные методы идентификации чернил, в том числе анализ методом ТСХ. Образцы, которые соскабливают с бумаги с помощью приспособления, изготовленного из иглы № 16 для подкожных инъекций, затем в зависимости от их растворимости элюируют этанолом, пиридином или смесью этанола с водой (1:1). Образцы, отобранные с бумаги, где пересекаются две и более линии, содержат больше чернил, чем образцы, полученные с одиночных линий. Хроматографирование проводят на целлюлозе, элюируя пробу смесью *n*-бутанол—изопропанол—дистиллированная вода (2:1:1), и на силикагеле, элюируя смесью *n*-бутанол—этанол—10 %-ный раствор щавелевой кислоты (10:2:3), при длине пути элюирования 7,5 см.

#### 4. КРАСИТЕЛИ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ

Вальди [60] разделил ряд красителей на слоях силикагеля G, применив растворитель, состоящий из хлороформа, ацетона, изопропанола и сернистой (от 5 до 6 % SO<sub>2</sub>) кислоты (3:4:2:1). Для исследованных красителей он получил следующие величины  $R_f$ : акридиновый оранжевый 0,41; щелочной синий 0,16 и 0,34, бриллиантовый зеленый 0,59; бриллиантовый крезильный синий 0,21 и 0,52; эрихромазуроловый S 0,39, гентский фиолетовый 0,43 и 0,48; кристаллический фиолетовый 0,43; светло-зеленый 0,11, малахитовый зеленый 0,35; метаниловый желтый 0,39; метиленовый синий B 0,9; метиленовый зеленый 0,18 и виктория синий 0,51.

Штир и Шпехт [61] исследовали ряд ксантеновых гистологических красителей. Красители хроматографировали на слоях силикагеля G с тем же растворителем, который использовал Вальди [60], и со смесями *n*-пропанол—муравьиная кислота (8:2), 75 %-ный раствор ацетата натрия—1 %-ная соляная кислота—метанол (4:1:4). Штир и Шпехт [61] проводили также разделение красителей на слоях активированной фосфорилированной целлюлозы со смесями ацетатный буферный раствор (веронал)—этанол (5:3), pH 3 и 8.

Гистологические красители можно разделить на четыре группы: 1) главным образом пиронин G; 2) смесь пиронина, пиронина Y, родамина S и акридинового красного; 3) главным образом родамин B и 4) главным образом родамин G. Красители различного происхождения, имеющие близкие названия, иногда могут сильно отличаться по составу.

Горобин и Гольдштейн [62] исследовали примеси в 11 образцах красителей альциановый синий, астра синий, альциановый желтый и альциановый зеленый, хроматографируя их на целлюлозе смесями *n*-бутанол—вода—уксусная кислота; если разделение велось в закрытых камерах, соотношение компонентов составляло 3:3:1, если в открытых камерах, то 4:4:1. Добрес и Моутс [63] хроматографировали красители лазурный A, B и C, метиленовый синий, толуйдиновый синий O, тиониновый, пириновый B и Y, метиловый зеленый, кристаллический фиолетовый, амидовый черный 10B и буффало черный (NBR) на силикагеле G, элюируя пробы смесями *n*-пропанол—*n*-бутанол—аммиак—вода (4:4:1:1) и *n*-пропанол—аммиак—вода (8:1:1). Последняя смесь, но с соотношением компонентов 7:2:1 применялась также для разделения на пластинках адсорбсила. Лоуч [64] проводил опыты с метиленовым синим, метиленовым фиолетовым, лазурным A, B и C и тиониновым красителями на силикагеле. Наиболее эффективное разделение красителей и их продуктов окисления и фотодеструкции

получено при тройном элюировании смесью 95 %-ный этанол—хлороформ—уксусная кислота (17:2:1) на листках Бринкмана MNSil-N-Hg/UV (254). Разделение проводили в темноте в насыщенной атмосфере. Горобин и Мергатройд [65] сравнивали хроматографию на бумаге, тонкослойную хроматографию на силикагеле HF-245 и тонкослойный электрофорез на агаре по достигаемому разрешению компонентов гистологических красителей. Тонкослойная хроматография превосходила хроматографию на бумаге и в некоторых случаях позволяла разрешить больше компонентов, чем электрофорез, в то же время последний был эффективнее при разделении других красителей. Для ТСХ в качестве растворителей применяли следующие смеси: *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5); 1 %-ная соляная кислота (масса на объем)—0,75 %-ный раствор ацетата натрия (масса/объем)—метанол (4:1:4); бензол—пропионовая кислота (4:1); хлороформ—метанол (4:1); уксусная кислота—ацетат этилцеллозольва—вода (1:2:2), а также концентрированный аммиак, диметилформамид и воду. К сожалению, авторы [65] не привели ни одного значения  $R_f$  и не указали, какой из растворителей дает лучшие результаты при анализе того или иного красителя. В некоторых случаях были исследованы дублирующие образцы, полученные из разных источников, при этом оказалось, что составы этих образцов могут значительно различаться. Электрофорез проводили на 0,8-миллиметровом слое агара при pH 4 и 9. Горобин [66] дал список примесей, содержащихся в биологических красителях.

Горобин и Мергатройд [67] хроматографировали 27 серийных образцов пиронина и родамина на листках силикагеля Eastman, элюируя пробы смесью хлороформ—метанол (4:1). Обнаружены и разделены семь различных красных красителей. Ленсинк [68] разделил на компоненты судановый черный V, хроматографируя его на силикагеле со смесью хлороформ—бензол (1:1). Кремер и др. [68а] использовали силикагель и растворители Добреса и Моутса [63] для анализа тиазиновых красителей, входящих в составы гистологических красителей Гисма.

Соли тетразолия — практически неокрашенные соединения — применяют в гистохимии для точного обозначения мест окисления тканей, потому что эти соли восстанавливаются с образованием сильно окрашенных формазанов. Тирер и др. [69] хроматографировали смесь 10 таких солей, а также смесь формазанов, образовавшихся при их восстановлении. Адсорбентом служил силикагель G, а растворителем — смесь *n*-бутанол—вода—уксусная кислота (78:17:5) для солей и смесь гексан—дихлорметан (2:3) для формазанов. Гросман и Вагнер [70] исследовали нитросиний тетразолиевый краситель, полученный из четырех различных источников, методом тонкослойной гель-

фильтрации на сефадексе G-25 Superfine с 0,9 %-ным раствором хлорида натрия. Джонс [71] хроматографировал 9 бистетразолиевых солей на силикагеле F, элюируя пробы смесью 3-метил-1-бутанол—муравьиная кислота—вода (8:1:1). Пятна были обнаружены опрыскиванием щелочным раствором аскорбиново-кислого натрия. Балог и др. [71а] использовали для хроматографирования монотетразолиевых солей слой силикагеля H и целлюлозы MN 300, взятых в соотношении 2:1, и смесь *n*-бутил-ацетат—*n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2:1). Для бистетразолиевых солей применяли растворитель, содержащий те же компоненты, но в соотношении 7:3:5:3. Визуальное наблюдение проводили после обнаружения пятен щелочным раствором дитионата натрия, глицеринового или гликолевого альдегида.

## 5. ИНДИКАТОРЫ

Вальди [60] разделил ряд индикаторов на смеси силикагеля G и оксида алюминия (1:1), используя в качестве растворителя этилацетат, метанол и 5 н. раствор гидроксида аммония (6:3:1), и получил для этих индикаторов следующие значения  $R_f$  (в некоторых случаях были еще обнаружены пятна примесей, но здесь приводятся только данные для основных пятен): хлорфеноловый красный 0,27; бромкрезоловый пурпурный 0,40; крезоловый красный 0,42; *m*-крезоловый пурпурный 0,43; бромфеноловый синий 0,48; бромхлорфеноловый синий 0,48; бромтимоловый синий 0,65; бензиловый оранжевый 0,67; метиловый оранжевый 0,67; тимоловый синий 0,74; фенолфталеин 0,83 и *n*-этоксихризоидин 0,84.

Алиотта и Розо [72] хроматографировали ряд индикаторов на силикагеле, не содержащем добавок, и силикагеле, пропианном буферным раствором фталата с pH 6,0, применяя в качестве растворителя бутанол, насыщенный водой. Таким образом были исследованы феноловый красный, хлорфеноловый красный, бромфеноловый красный, бромхлорфеноловый синий, бромфеноловый синий, крезоловый, иодфеноловый синий, *m*-крезоловый пурпурный, бромкрезоловый пурпурный, бромкрезоловый зеленый, тимоловый синий и бромтимоловый синий. Ретти и Гейнес [58] разделяли тимоловый синий, бромфеноловый синий и феноловый красный индикаторы на силикагеле G, элюируя их смесями амиловый спирт—этанол—аммиак (10:9:1), этилацетат—пиридин—вода (6:3:1) и бензол—изопропанол—уксусная кислота (60:40:1).

Маровский и Фабрициус [73] исследовали образцы индикатора феноловый красный, полученные из различных источников, хроматографируя их на силикагеле смесью *n*-бутанол—

этанол—5 %-ный раствор аммиака (4:1:1). Чианг и Йе [74] хроматографировали 12 распространенных индикаторных красителей на адсорбенте, состоящем из полиамида и силикагеля (1:5,2), используя как кислотные, так и основные составные растворители, содержащие от 0,5 до 7 % хлорида натрия, вводимого для уменьшения действия водородных связей. Флуоресцентные красители, которые применяются как индикаторы адсорбции, разделяли на силикагеле со следующими растворителями. хлороформ—уксусная кислота (9:1), бензол—уксусная кислота (9:1) [75] и толуол—уксусная кислота (13:7) [76].

## 6. КОСМЕТИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ

Пинтер и Кремер [77] исследовали синие и зеленые красители и те красители, которые можно наносить на кожу, но не на веки и не на губы. Сначала образцы (0,2 г) нагревали с двумя добавляемыми последовательно порциями лигроина по 5 мл каждая. После этого остаток дважды экстрагировали 50 %-ным этанолом порциями по 2 мл. Хроматографирование проводили на силикагеле, элюируя пробу смесью хлороформ—ацетон—*n*-пропанол—сернистая (9 % SO<sub>2</sub>) кислота (2:5:2:1). Затем красители с  $R_f$  меньше 0,20 еще раз элюировали смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (25:6:19), содержащей 0,4 % хлорида калия. Для того чтобы различить красители, не полностью разделенные первым растворителем, можно использовать цветную реакцию. С этой целью пластинку опрыскивают 4 %-ной соляной кислотой или раствором гидроксида натрия. Красители с цветными индексами (С. I.) 60730 и 62085 не удается разделить полностью, но их можно различить соответственно по лиловому и синему окрашиванию, появляющемуся после элюирования вторым растворителем. После обработки двумя растворителями красители имели следующие величины  $R_f \times 100$ . 42095\*—0 и 14, 7; 10020—15, 10, 63000—0 и 17,0 и 41; 19140—18 и 35; 44090—20, 19; 4535—24, 23; 52015—28, 19, 42100—33 и 39; 31 и 28; 42080—49, 40; 61570—53, 36; 62085—76, 60; 60730—77, 67; 42040—78, 60; 43820—82, 67; 42140—83, 67.

Перди [78], элюируя пробы смесью бензол—нитробензол (5:1), разделил на воздушносухом силикагеле G косметические азокрасители: ганза желтый G, ганза желтый 10G, ганза желтый GR, ганза желтый 3R, перманент красный GG, перманент красный F4RH, перманент карминовый FB, перманент коричневый FG, ярко-красный и толуидиновый красный.

## Красители для губной помады

Десюсс и Десбом [79] использовали смесь *n*-пропанола и аммиака в соотношении 9:1 и адсорбент силикагель G для разделения 11 красителей, применяемых при изготовлении губной помады. Рюдт [80] пользовался этой же смесью растворителей для разделения 12 ксантоновых красителей, применяемых в губной помаде, и получил количественные результаты, сняв спектры поглощения элюата в области от 450 до 550 нм. Давидек и др. [81] для разделения красителей, применяемых в губной помаде, провели хроматографирование на незакрепленном слое оксида алюминия. Эти авторы привели величины  $R_f$  ряда красителей и результаты анализа нескольких торговых образцов губной помады.

Котсис и Гери [82, 83] описали методику разделения и идентификации красителей для губной помады на слоях силикагеля (адсорбосил-1), закрепленных кальцием. Красители экстрагировали из губной помады смесью 3 частей бензола и 1 части ацетона; образцы помады кипятили с этой смесью в колбе с обратным холодильником. Для разделения использовали смеси растворителей трех видов: бензол—метанол—гидроксид аммония (65:30:4), бензол—*n*-амиловый спирт—концентрированная соляная кислота (65:30:5) и бензол—*n*-пропанол—гидроксид аммония (6:3:1). Для количественной оценки проводили элюирование пятен и определяли поглощение элюата на спектрофотометре.

Силк [84] также анализировал красители для губной помады методом ТСХ на слоях силикагеля. Он наносил образцы помады непосредственно на пластинку, втирая размяченную губную помаду в слой силикагеля толщиной 375 мкм (такая толщина слоя способствует адсорбции масел, входящих в состав помады). Большинство красителей можно разделить элюированием двумя растворителями: а) дихлорметаном и б) смесью этилацетат—метанол—гидроксид аммония, разбавленный в 3—7 раз (15:3:3); однако когда в состав образца входил краситель красный № 7 Д и С, то применяли пластинки, буферированные раствором фосфата. В последнем случае проводили элюирование сначала смесью *n*-бутанол—95 %-ный этанол—гидроксид аммония (20:4:3), а затем растворителем б. Количественные измерения осуществляли спектрофотометрически.

Перди [85] наносил губную помаду непосредственно на слой адсорбента. При использовании 13 типов неподвижных фаз и 41 системы растворителей были разделены более 150 красителей, из которых 37 найдены в губных помадах. Применяя метод непосредственного нанесения и ряд избирательных подвижных фаз, указанные авторы с помощью трех- или пятикратного

\* Пяти и четырехзначные числа — это цветные индексы красителей — Прим перев

хроматографирования смогли расшифровать большинство представляемых на продажу составов. Для анализа наиболее сложных смесей и для концентрирования вспомогательных красителей, входивших в состав исходных образцов в ничтожных количествах, применяли метод экстракции смесью диметилформамида и 85 %-ной фосфорной кислоты (20 : 1). В результате комбинирования этого метода с разделением с несколькими подвижными фазами и с избирательным разделением на силикагеле и полиамиде были выделены три группы красителей, которые затем анализировали методом ТСХ. Леман и Ректенвальд [86] растворяли образец в теплом диметилформамиде и из полученного раствора экстрагировали петролевым эфиром жиры и парафины. Оставшийся раствор в диметилформамиде разбавляли водой в отношении 1 : 1 и обесцвечивали полиамидом. Далее полиамид промывали водой и метанолом и элюировали красители смесью метанола с аммиаком (19 : 1). Йорк и др. [87] после разделения на силикагеле смесью этилацетат—метанол—25 %-ный раствор аммиака (5 : 2 : 1) определяли эозин посредством флуоресцентного сканирования.

### Красители для волос

Браун [88] опубликовал обзор по химии красителей для волос и рекомендовал смесь петролейный эфир—ацетон—аммиак (уд. масса 0,88) (30 : 10 : 1) и силикагель в качестве системы, пригодной для разделения наиболее простых оснований, входящих в состав окислительных красителей для волос. Для больших молекул типа N-замещенного нитро-*n*-фенилендиамина можно увеличить содержание ацетона до 20 долей. Окислительные красители для волос представляют собой смеси промежуточных красящих веществ, поверхностно-активных реагентов, средств для улучшения качества волос, сульфитов, аммиака и духов. Анализ их сложен тем, что промежуточные красящие вещества легко окисляются. Гордынска и Легатова [89] смешивали 4 г образца с 1 мл 5 %-ного раствора бисульфита натрия и 6 мл этанола. В случае необходимости смесь фильтровали и 20 мкл раствора наносили на слой силикагеля G. В одном направлении хроматограмму элюировали нижней фазой смеси аммиак—вода—легкий петролейный эфир—хлороформ—*n*-бутанол (4 : 13 : 10 : 50 : 5), а во втором, перпендикулярном, направлении тем же растворителем, которым пользовалась Коттеман [90], а именно смесью хлороформ—этилацетат—этанол—уксусная кислота (35 : 10 : 6 : 2). Амины и аминифенолы обнаруживали 1 %-ным раствором 4-диметиламинобензальдегида, полифенолы—раствором диазотированного бензидина (проба Т-36). Коттеман использовала один и тот же растворитель,

только на каждые 20 мл аммиака добавляла 2 мл 50 %-ной гипофосфорной кислоты. Она выделила хроматографированием 30 промежуточных красящих веществ и исследовала пять растворов ранее не известных промежуточных красящих веществ. Разработанная методика позволяет обнаружить в исходном растворе красителя 0,02 % промежуточного красящего вещества. Однако гидрохинон вследствие его легкой окисляемости при содержании менее 0,1 % обнаружить не удается. К числу других растворителей, использованных для разделения этих соединений, относятся смеси *n*-бутилацетат—бензол (2 : 1) [91] и диизопропиловый эфир—ацетон—изопропанол (10 : 1 : 1) [92]. Такекура [91] указал значения  $R_f$  и цвета (при обнаружении диаминобензальдегидом) 20 соединений. Зелазна и Легатова [93] экстрагировали красящие вещества из эмульсионных красителей для волос уксусной кислотой, предварительно разрушив эмульсию замораживанием. В качестве элюирующего растворителя они применяли смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—этанол—вода (50 : 1 : 10 : 40), а обнаружение при визуальном наблюдении проводили 1 %-ным раствором хлорида железа. Гольдштейн и др. [94] исследовали 28 красителей с помощью 37 различных хроматографических систем.

### 7. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ

В работе [95] описано разделение оптических отбеливателей, полученных из стильбена, на слоях, приготовленных из равных по массе количеств оксида алюминия и 2,5 %-ного раствора карбоната натрия. Растворителями служили смеси бутанол—этанол—вода (2 : 1 : 1) и моноэтиловый эфир диэтиленгликоля—2 %-ный раствор гидроксида аммония (4 : 1). Латинак [96] применял два метода хроматографирования этих соединений на слоях силикагеля—прямой и косвенный. Для прямого разделения он использовал смеси *n*-пропанол—5 %-ный раствор карбоната натрия (2 : 1), *n*-бутанол—пиридин—вода (1 : 1 : 1), *n*-бутанол—пиридин—25 %-ный раствор аммиака (1 : 1 : 1) и *n*-пентанол—пиридин—25 %-ный раствор аммиака (1 : 1 : 1). Как выяснилось, величины  $R_f$  зависят от природы заместителей у триазинового кольца и возрастают в следующем порядке. Величины  $R_f$  *цис*-изомеров ниже, чем у соответствующих *транс*-изомеров. В косвенном методе сначала окисляли изучаемые соединения щелочным перманганатом и после этого хроматографировали полученные альдегиды.

Шлегельмильх и др. [97] разделяли флавоновые кислоты, применяемые как флуоресцентные оптические осветлители, методом ТСХ на ацетатцеллюлозе со смесью хлороформ—мета-

нол—буферный раствор (1:3:1), на целлюлозе со смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—10 %-ный раствор хлорида натрия (4:1:1) и на силикагеле или оксиде алюминия со смесью метилэтилкетон—диэтиламин—25 %-ный раствор аммиака (3:1:1). Тайдель и Шмитц [98] разделили 16 оптических осветлителей, применяя слои полиамида и смеси метанол—вода—аммиак (10:1:4) и метанол—6 н. соляная кислота (10:2), а также силикагель G и смеси *n*-гексанол—пиридин—этилацетат—аммиак—метанол (5:5:5:5:3) и бензол—хлороформ (2:3). Экстракция красителей проводилась следующими растворителями: этиленгликоль—аммиак (7:3) и пиридин—вода (1:1). Авторы [98] дали таблицу величин  $R_f$ , включая  $R_f$  *цис*- и *транс*-изомеров. Фигге [99] классифицировал 18 оптических осветлителей в соответствии с их растворимостью в различных растворителях. Неионные осветлители отделяли от ионных хроматографией на силикагеле с применением щелочных полярных растворителей. Далее каждую группу разделяли на индивидуальные соединения методом одно- или двумерной ТСХ. В статье указаны 19 составных растворителей.

## 8. ТЕКСТИЛЬНЫЕ КРАСИТЕЛИ

Все прочие красители, кроме рассмотренных выше пищевых, косметических, флуоресцентных, гистологических красителей и чернил, применяются главным образом в текстильной промышленности. Их можно разделить на 10 классов [100], а именно: кислотные красители, азокрасители и азокомпоненты красителей, основные, прямые, дисперсные, реактивные, протравные красители, красители, применяемые с растворителями, серные и кубовые красители. Естественно, что некоторые из уже упомянутых выше красителей также входят в эти перечисленные классы Ретти и Гейнес [58] и Менон [101] опубликовали обзоры по использованию ТСХ для разделения красителей. Рэйберн и др. [102] показали, насколько важна ТСХ как метод анализа при производстве красящих веществ и привели некоторые примеры ее применения. С помощью ТСХ, в частности, можно определить светостойкость, стойкость к выцветанию при контакте с газами, содержание поверхностно-активных веществ и текстильных смол.

Суини [103] дал список растворителей, пригодных для экстракции красителей из различных волокон. Диметилсульфоксид — один из таких наиболее эффективных растворителей, однако он растворяет ацетатные волокна, поэтому при работе с ацетатными волокнами предпочтителен моноклорбензол. После экстракции следует концентрировать раствор красителя при

низкой температуре и под вакуумом, чтобы свести к минимуму возможность деструкции. Для получения пятен на хроматографической пластинке достаточно 2—4 мкл 1 %-ного раствора. Для экстракции кубовых красителей, окрашивающих хлопчатобумажные ткани, достаточно хороших растворителей пока подобрать не удалось; для этой цели можно использовать диметилсульфоксид, пиридин, нитробензол и диметилформамид, однако в зависимости от природы растворителей результаты могут быть и плохими, и хорошими [103].

## Прямые красители

Суини [103] рекомендует ряд элюирующих растворителей для различных классов красителей; для хроматографирования прямых красителей на слоях силикагеля он предлагает следующие смеси: пропанол—вода—уксусная кислота (5:3:1), бутилацетат—пиридин—вода (5:5:2), бутанол—ацетон—вода (5:5:3) и органический слой в системе бутанол—вода—аммиак (2:1:1). Браун [104] считает, что в качестве растворителя пригодна следующая смесь: *n*-бутанол—этанол—аммиак—пиридин—вода (8:3:4:4:3). Меккель и др. [105] разделили девять прямых азокрасителей на ряд компонентов, проводя хроматографирование на слоях силикагеля и оксида алюминия, содержащих 2,5 % карбоната натрия; на силикагеле разделение было более четким, но элюирование заняло больше времени. Элюирующим растворителем служила смесь бутилацетат—пиридин—вода (6:9:5). Рабан [106] разделил на компоненты на оксиде алюминия со смесью этанол—вода в качестве растворителя следующие азокрасители: конго красный (цветной индекс 22120), трипан синий (23850), прямой синий (22610), прямой зеленый R (30295), бензопурпурин (23500) и прямой красный F (22310). Соотношения компонентов в смеси растворителей менялись в зависимости от типа оксида алюминия. Логар и др. [106a] привели величины  $R_f$  61 прямого красителя, полученные для хроматографирования системы силикагель *n*-бутилацетат—пиридин—хинолин—вода (3:3:1:3). Вада и др. [106b] нашли, что для 190 кислотных и прямых красителей кожи при хроматографировании на силикагеле наилучшим из испытанных ими растворителей является смесь 95 %-ный этанол—разбавленный (1:9) аммиак—*n*-бутанол (9:2:3).

## Кислотные красители

Для разделения кислотных красителей на силикагеле можно использовать следующие смеси растворителей: пропанол—

ацетон—вода—уксусная кислота (5:5:3:1), пиридин—бутил-ацетат—вода (9:6:5), *n*-бутанол—этанол—вода (2:1:1), пропанол—28 %-ный аммиак (1:1) [103]. Ретти и Гейнес [58] установили, что при разделении флуоресцентных красителей на силикагеле наилучшие результаты дает смесь бензола и пропионовой кислоты (4:1); однако при разделении моно- и дигалогенпроизводных эти авторы предпочитают пользоваться смесью бензол—хлороформ—пропионовая кислота (2:2:1). Меккель и др. [105] разделяли красители бензиловый стойкий красный GRG, палатин стойкий зеленый GN и палатин стойкий красный на силикагеле, приготовленном с 2,5 % карбоната натрия, элюируя пробу смесью бутилацетат—пиридин—вода (6:9:5). Антрахиноновые красители можно хроматографировать на слоях целлюлозы или силикагеля, элюируя пробу смесью *n*-бутилацетат—пиридин—вода (2:2:1) [58]. Логари и др. [106а] использовали слой кизельгура и смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (2:1:5).

### Основные красители

Для разделения основных красителей на силикагеле можно применять смеси бутанол—этанол—вода—уксусная кислота (10:1:1:1) или бензол—метанол (9:1) [103]. Ретти и Гейнес [58] предпочитают для разделения основных азокрасителей смесь хлороформа и метанола (4:1). Логар и др. [107, 108] хроматографировали 19 основных красителей, применяемых для крашения полиакрилонитрила, на оксиде алюминия со смесью этанол—вода (5:2) и 11 других красителей на силикагеле G со смесью пиридин—вода (1:2). Арсов и др. [109] анализировал 23 основных красителя на силикагеле, элюируя пробы смесями хлороформ—метилэтилкетон—уксусная кислота—муравьиная кислота (8:6:1:1), хлороформ—*n*-пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (8:6:1:1:2), хлороформ—метилэтилкетон—муравьиная кислота (6:8:1) и хлороформ—изопропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (6:12:3:1:1 и 6:8:3:1:2). Испытаны также еще три варианта последнего состава. Такешита и др. [110] разделили хроматографически 15 основных красителей, а именно: фуксиновый основной, кристаллический фиолетовый, этиловый фиолетовый, малахитовый зеленый, ночной синий, бисмарк коричневый, нейтральный красный, сафранин O, акридиновый оранжевый, метиленовый синий, новый метиленовый синий, Нил синий, пирониновый G и родаминовый B. Разделение проводилось на слоях полиамида с 5 растворителями, включая метанол, этанол, смеси 28 %-ного аммиака и ме-

танола (1:8) бензола и метанола (5:1) и тетрахлорида углерода и метанола (4:1).

### Дисперсные красители

Суини [103] рекомендует применять для хроматографического разделения дисперсных красителей на силикагеле смеси бензол—ацетон (9:1) и бензол—хлороформ—ацетон (5:2:1). Уолленуэбер [18] разделял антрахиноновые красители на слоях порошкообразной ацетилованной целлюлозы с 10 %-ным содержанием ацетильных звеньев. Для хроматографической системы целлюлоза MN 300 Ac или MN 300 G/Ac и смеси этилацетат—тетрагидрофуран—вода (6:35:47) получены следующие величины  $R_f$ : 1,4-диоксидантрахинон (хинизарин, цв. инд. 58050) 0,15 и 0,06; 4-амино-1-оксиантрахинон (дисперсный красный 15, цв. инд. 60710) 0,22 и 0,11; 1,4-диаминоантрахинон (дисперсный фиолетовый 1, цв. инд. 61100) 0,32 и 0,21. Хотя для разделения указанных красителей вполне пригодны целлюлоза и смеси тетрагидрофурана, воды и 4 н. уксусной кислоты, Ретти и Гейнес [58] предпочитают проводить хроматографирование антрахиноновых красителей и промежуточных продуктов на силикагеле с хлороформом или смесью ацетона и хлороформа. 1-Амино-, 2-амино-, 1,2-диамино- и 1,4-диаминоантрахиноны удается эффективно разделить смесью хлороформ—ацетон (9:1). Гемзова и Гаспарич [111] хроматографировали на оксиде алюминия 30 дисперсных азокрасителей, применяя в качестве растворителей бензол и хлороформ. Доушева и др. [111а] разделили на силикагеле (тип 60) 27 дисперсных красителей. Лучшим растворителем оказалась смесь *n*-гексан—этилацетат—ацетон (5:4:1). Франк и Гайкова [112, 113] хроматографировали несколько аминокантрахинонов на незакрепленных слоях оксида алюминия (активность III). Разделение проводили со смесью циклогексан—эфир (1:1), а количественные измерения выполняли, определяя непосредственно оптическую плотность пятен с помощью денситометра Цейса, обеспечивавшего точность определения  $\pm 6\%$ . В результате для ряда аминокантрахинонов были получены следующие значения  $R_f$ : 1-амино- 0,62; 2-амино- 0,23; 1,2-диамино- 0,65; 1,4-диамино- 0,10; 1,5-диамино- 0,46; 1,8-диамино- 0,35; 2,6-диамино- 0,00; 1,6-диамино- 0,08 и 1,7-диамино- 0,14. Баншо и др. [114] хроматографически разделили группу из 17 аминокантрахинонов на оксиде алюминия, используя 4 различных растворителя. Результаты разделения сведены в таблицу (см. также гл. XXVI, разд. 8 и 19, где приведены хроматографические характеристики некоторых природных антрахинонов).

### Реактивные красители

Браун [104] дает следующую методику экстрагирования реактивных красителей из целлюлозы:

1. 100 мг красящего вещества встряхивают 20 мин с 2 мл 90 %-ной (по объему) серной кислоты.
2. Экстракт выливают в 50 мл холодной дистиллированной воды.
3. Осторожно кипятят в течение 2 мин.
4. Охлаждают до комнатной температуры.
5. Добавляют 0,4 мг очесов аминоэтилцеллюлозы.
6. Взбалтывают 5 мин или до тех пор, пока не адсорбируется весь краситель.
7. Фильтруют на пористом стеклянном фильтре № 3 под вакуумом.
8. Промывают 200 мл холодной дистиллированной воды.
9. Отсоединяют вакуумный насос и заменяют колбу для сбора фильтра на чистую.
10. Добавляют 25 мл 10 %-ного (по объему) аммиака (уд. масса 0,880), взбалтывают и дают отстояться в течение 2 мин.
11. Фильтруют и фильтрат упаривают.
12. Растворяют краситель в диметилформамиде.

Ци [115] опубликовал обзор по хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии реактивных красителей. Перкавач и Перпар [116] применяли для разделения ряда реактивных красителей, содержащих триазинные кольца, пиримидиновые кольца, винилсульфоновые группы или сульфонамидные группы, смеси изобутанола, *n*-пропанола, этилацетата и воды (2:4:1:3), диоксана и ацетона (1:1) и *n*-пропанола, этилацетата и воды (6:1:3). Щухи и др. [117] использовали смесь изопропанола и аммиака (2:1) для разделения нескольких реактивных красителей марки «Процион» на силикагеле. В состав этой группы красителей входили: процион бриллиантовый красный МХ-8В, процион тюркуаз Н-А и процион желтый МХ-2R. Ци и Гаспарич [118] приводят величины  $R_f$  для 41 реактивного красителя марки «Ремазол» в трех формах, а именно: винилсульфоновой, 2-оксиэтилсульфоновой и в форме 2-оксиэтилсульфонового сульфозэфира. Хроматографирование проводилось на силикагеле G со смесями *n*-бутилацетат—пиридин—вода (2:2:1) и *n*-бутилацетат—уксусная кислота—вода (2:2:1). Такая же комбинация была использована для разделения дихлороксалиновых красителей [119]. Душева и др. [120] хроматографировали 13 реактивных монохлортриазокрасителей на силикагеле с 12 различными растворителями.

### Протравные красители

Шетти [121—125], а также Шетти и Кастер [126] провели разделение нескольких хромовых и кобальтовых комплексов азо- и изометинных красителей. Разделение было выполнено на высушенных при 120°C слоях оксида алюминия с метанолом в качестве элюирующего растворителя. Изучая металлические комплексы 29 азокрасителей, Поллард и др. [127] проверяли чистоту азокрасителей (до комплексобразования), проводя хроматографирование на силикагеле G, содержащем связующую добавку—крахмал. Наилучшие результаты дали следующие смеси: петролейный эфир (40—60°C)—диэтиловый эфир—этанол (10:10:1), *n*-бутанол—этанол—2 н. раствор аммиака (3:1:1) и изопропанол—метилэтилкетон—аммиак (уд. масса 0,88) (4:3:3). Тоул и Моукова [128] хроматографировали другую группу подобных соединений—*o*-оксизамещенные моноазокрасители, многие из которых применяются в аналитической и координационной химии N-гетероциклических соединений. Были использованы дезактивированные слои силикагеля и следующие смеси растворителей: бензол—уксусная кислота (4:1), бензол—хлороформ—уксусная кислота (25:5:6,2), тетрагидрид углерода—уксусная кислота (15:4), тетрагидрид углерода—этилацетат—уксусная кислота (30:3:2) и тетрагидрид углерода—уксусная кислота (15:2). В этом случае кислотные составные части растворителей подавляли образование комплексов со следами примесей металла, содержащимися в адсорбенте. Этими авторами приведены величины  $R_f$ , определенные как в условиях насыщения хроматографических пластинок парами растворителя, так и без насыщения.

### Азокрасители и азокомпоненты красителей

Для этих красящих веществ требуется добавка связывающего соединения, при взаимодействии с которым в волокне или на волокне образуется краситель. Перкавач и Перпар [129] разделили хроматографированием на силикагеле группу из семи таких стойких оснований, применяя в качестве растворителей смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (16:4:5) и *n*-бутанол—пиридин—вода (1:2:1). Пятна обнаруживали, обрабатывая пластинки реактивом Т-90. Группу из девяти стойких солей (стабилизированных солей диазония) также разделяли на силикагеле смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (1:1:5). Гаспарич [130] хроматографировал 32 стойких основания на слоях оксида алюминия, используя бензол в качестве растворителя. Всего было проведено хроматографирование 86 образцов, так как испытывались красители, полученные от

различных изготовителей. Автор работы [130] обнаруживал пятна красителей также с помощью реактива Т-90. Тилеман [131] разделял  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтолы, используя их реакцию со стойкой черной солью В, стойкой черной солью G, стойкой фиолетовой солью В, стойкой красной солью ITR, стойкой синей солью ВВ, стойкой синей солью В, стойкой гранатовой (темно-красной) солью GBC и стойкой коринфской солью V. Образовавшиеся в результате красители Тилеман хроматографировал на силикагеле, элюируя пробы бензолом, смесями бензол—этилацетат (3:2), дихлорметан—этилацетат (3:2) и дихлорметан—этилацетат—диэтиламин (92:5:2).

### Красители, применяемые с растворителями

Вообще говоря, красители этой группы можно хроматографировать на силикагеле с бензолом, хлороформом, смесями бензола и тетрахлорида углерода (1:4), бензола и ацетона (1:1), хлороформа и метанола (9:1), гексана и этилацетата (9:1) и петролейного и диэтилового эфиров и уксусной кислоты (70:30:1), а также на оксиде алюминия со смесью гексана и этилацетата (49:1) или с тетрахлоридом углерода. В тех разделах, где речь шла о пищевых и косметических красителях и красящих веществах чернил, упоминался ряд красителей, растворимых в органических средах. Красители, применяемые с растворителями, используются также для окраски нефтепродуктов, древесины и пластиков.

Для того чтобы можно было различать различные сорта бензинов, к ним добавляют красители, придающие им характерную окраску. Хауссер [132] исследовал красящие вещества, предназначенные для окрашивания бензинов, применяемых в ФРГ. Чтобы повысить концентрацию красящего вещества, 1—10 мл бензина упаривали примерно до одной трети первоначального объема, добавляли петролейный эфир и вводили в колонку, заполненную оксидом алюминия. Колонку сначала тщательно промывали петролейным эфиром, высушивали и затем элюировали окрашенную зону небольшим количеством ацетона, после этого раствор в ацетоне упаривали до нескольких капель, которые наносили на пластинку для ТСХ. На слоях силикагеля пробу элюировали бензолом; для лучшего разделения целесообразно использовать клиновидные слои. Хауссер приводит величины  $R_f$  и указывает цвета пятен исследованных им образцов бензинов.

Фуджи и Камиккура [133] изучали разделение нескольких органических азокрасителей в 17 различных растворителях на слоях силикагеля. Величины  $R_f$ , полученные с двумя наиболее

эффективными растворителями, 1,1-дихлорэтаном и 1,1,2-трихлорэтаном, даны в табл. 21.6.

Таблица 21.6

Величины  $R_f \times 100$  некоторых азокрасителей, полученные на силикагеле [133]

Краситель	Цветной индекс <sup>a</sup>	Растворитель	
		1,1-дихлорэтан	1,1,2-трихлорэтан
Желтый пигмент 1	11680	39	38
Оранжевый пигмент 1	11725	25	30
Перманент оранжевый	12075	31	30
Красный пигмент	12085	47	45
Толуидиновый красный	12120	23	26
Красный пигмент 22	12315	16	18
Красный пигмент 18	12350	12	16

<sup>a</sup> Цветной индекс «Общества красильщиков и колористов», Бредфорд, 1956.

### 9. ПРОЧИЕ КРАСИТЕЛИ

Гаспарич [134] разделил группу азокрасителей на слоях силикагеля. Исследуемые образцы он наносил на слои в виде растворов ДМФ; растворы крап-лаков необходимо было подогреть. Для того чтобы избежать влияния растворителя на разделение, его необходимо полностью испарить. Красящие вещества подразделяются на пять типов: 1) вещества, содержащие ацетоацетариламиды, 2) вещества, содержащие 2-нафтол; 3) пиразолоновые азокрасители, 4) вещества, содержащие ариламиды 2-окси-3-нафтойной кислоты, и 5) крап-лаки азокрасителей, содержащие карбокси- и (или) сульфогруппы. Первые четыре группы красящих веществ разделяют бензолом, причем иногда требуется многократное разделение, а в некоторых случаях применяется толуол. Вещества пятой группы хроматографируют смесями *n*-бутилацетат—уксусная кислота—вода (4:2,5:1), 1-пропанол—*n*-бутилацетат—аммиак (2:1:1) и 1-пропанол—аммиак (2:1). Последний растворитель особенно эффективен при разделении крап-лаков с одной и двумя сульфогруппами.

Масшляйн-Кляйнер [135] использовал ТСХ, чтобы по содержанию хинонов различать старые и современные красители. Образцы красителей хроматографировали на ацетилованной



Цвет	Кислотный электрофорез		Краситель	Основной электрофорез	
	пройденное расстояние, мм	направление движения		направление движения	пройденное расстояние, мм
Желто-красный	25	Анод	Метиловый оранжевый	Анод	Оранжевый
Красный	0		Метиловый красный	Анод	Желтый
Желтый	0		Диметиловый желтый		"
Синий	0		Конго красный	Анод	Красный
Черный	0		Эрихромовый черный Т	Анод	"
Красный	65	Анод	Кристаллический пучковый	Анод	"
Красный с NaOH	80	Анод	Фенолфталеин	Катод	"
Бесцветный	14	Катод	Тимолфталеин		"
Желтый	51	Анод	Бромфеноловый синий	Анод	Синий
Желто-зеленый	28	Анод	Флуоресцеин	Анод	Желтый
Красный	0	Анод	Родамин В		Красный
Видимый в УФ-свете	25	Анод	Ализариновый S	0	Видимый в УФ-свете
Видимый в УФ-свете	37	Анод	Неокарминовый		Синий
Видимый в УФ-свете	56	Анод		Анод	Желтый
Видимый в УФ-свете	75	Анод		Анод	Красный
Синий	0				"
Желтый	0				"
Красный	78	Анод			"
Красный	85	Анод			"

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Alfred Hueithig Verlag.

<sup>б</sup> Методику приготовления слоев адсорбента и электролитов см. в тексте.

целлюлозе со смесью этилацетат—тетрагидрофуран—вода (6:36:47). В работе приведены хроматограммы кошениля, креп-марены, кермеса, неочищенного шеллака, подмаренника, сандала, хенны, орехового дерева, альканны красильной, кармамина, а также для маренового, пурпуринового, кошенилевого и ализаринового крап-лаков.

## 10. РАЗДЕЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЕЙ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Пастушка и Тринкс [136] применили тонкослойный электрофорез для разделения некоторых красителей как в кислотной, так и в основной средах (табл. 21.7). Для разделения в кислотной среде приготавливали слои силикагеля с 3 %-ной борной кислотой и через 20 мин в центр хроматографической пластинки вводили раствор красителя. Электролит для разделения получали, смешивая 80 мл этанола, 30 мл дистиллированной воды, 4 г борной кислоты и 2 г кристаллического ацетата натрия; смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 4,5. Электрофорез проводили в течение 120 мин при напряженности поля 10 В/см. Для разделения в основной среде слои силикагеля смешивали с 3 %-ным раствором борной кислоты. В этом случае к электролиту добавляли гидроксид натрия до pH 12.

Кридл [137] опубликовал данные о длине пути миграции при электрофорезе 26 пищевых красителей, полученных переработкой каменноугольной смолы, с применением кизельгура, силикагеля и оксида алюминия в качестве подложек. Электрофорез проводили в 1 н. растворе азотной кислоты, 0,1 н. растворе аммиака и в буферных растворах с pH 4,0; 6,0; 8,0 и 9,2.

Де Зееув [138] указал на возможность применения тонкослойной хроматографии с программированным изменением состава газовой фазы (ТСХ-ПП) для улучшения разделения некоторых красителей.

## ЛИТЕРАТУРА

- Mottier M., Potterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 123 (1952).
- Mottier M., Potterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 118 (1952).
- Lagoni H., Wortmann A., Int. Dairy Congr., 14th Rome, 1956.
- Lagoni H., Wortmann A., Milchwissenschaft, 11, 206 (1956).
- Lagoni H., Wortmann A., Milchwissenschaft, 10, 360 (1955).
- Janiček G., Pokorný J., Davídek J., Sb. Vys. Skoly Chem.-Technol. Praze, Technol., Oddíl Fak. Potravin. Technol., 6, 75 (1962).
- Davídek J., Pokorný J., Janiček G., Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 116, 13 (1961).
- Reiners W., Z. Anal. Chem., 229, 409 (1967).
- Montag A., Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 116, 413 (1962).
- Fujii S., Kamikura M., Shokuhin Eiseigaku Sasshi, 4, 96 (1963); Chem. Abstr., 59, 11691 (1963).
- Copius-Peereboom J. W., Chem. Weekbl., 57, 625 (1961).

12. Griddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R., J. Chromatogr., 16, 350 (1964).
13. Ciaska M. A., Casinovi C. G., „Thin-Layer Chromatogr. on Silica Gel in Food Colors“, in „Thin-Layer Chromatography“, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 212.
14. Barrett J. F., Rayn A. J., Nature, 199, 372 (1963).
15. Canuti A., Magrassi B. L., Chim. Ind. (Milan), 46, 284 (1964); Chem. Abstr., 61, 1171 (1964).
16. Synodinos E., Lotakis G., Kokkoti-Kotaki E., Chim. Chron. (Athens), 28, 77 (1963); Chem. Abstr., 60, 1089 (1964).
17. Naff M. B., Naff A. S., J. Chem. Ed., 40, 534 (1963).
18. Wollenweber P., J. Chromatogr., 7, 557 (1962).
19. Salo T., Salminen K., Suom. Kemistil., B, 35, 146 (1962).
20. Rai J., Chromatogr., 4, 211 (1971).
21. Copius-Peerboom J. W., Beekes H. W., J. Chromatogr., 20, 43 (1965).
22. Frodyma M. M., Frey R. W., Williams D. J., J. Chromatogr., 13, 61 (1964).
23. Brain K. R., Turner T. D., Jones B. E., J. Pharm. Pharmacol., 23, 250 S (1971).
24. Brain K. R., Jones B. E., Turner T. D., J. Chromatogr., 109, 383 (1975).
25. Davidek J., Janiček G., J. Chromatogr., 15, 542 (1964).
26. Ramamurthy M. K., Bhalerao V. R., Analyst (London), 89, 740 (1964).
27. Hoodless R. A., Thomson J., Arnold J. E., J. Chromatogr., 56, 332 (1971).
28. Mottier M., Potterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 44, 293 (1953).
29. Mottier M., Potterat M., Anal. Chim. Acta, 13, 46 (1955).
30. Mottier M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 47, 372 (1956).
31. Official Method of Analysis, Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D. C., 7th Ed., 1950.
32. Davidek J., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 142, 410 (1970).
33. Davidek J., Davidkova E., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 131, 99 (1966).
34. Lehmann G., Collet P., Hahn H.-G., Ashworth M. R. F., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 1182 (1970).
35. Gilhooley R. A., Hoodless R. A., Pitman K. G., Thomson J., J. Chromatogr., 72, 325 (1972).
36. Takeshita R., Yamashita T., Itoh N., J. Chromatogr., 73, 173 (1972).
37. Alary J., Luu Duc C., Coeur A., Trav. Soc. Pharm. Lyon, 10, 78 (1966).
38. Logar S., Perpar M., Farm. Vestn., 18, 116 (1967); Chem. Abstr., 68, 62723a (1968).
39. Hayes W. P., Nyaku N. Y., Burns D. T., J. Chromatogr., 71, 585 (1972).
40. Davidek J., Davidkova E., J. Chromatogr., 26, 529 (1967).
41. Massart D. L., De Clercq H., Anal. Chem., 46, 1988 (1974).
42. Tewari S. N., Charma S. C., Charma V. K., Chromatogr., 7, 308 (1974).
43. Martin G. E., Figert D. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 217 (1974).
44. Lehmann G., Collet P., Moran M., Z. Lebensm., Unters. Forsch., 143, 191 (1970).
45. Graham R. J. T., Nya A. E., J. Chromatogr., 43, 547 (1969).
46. Graham R. J. T., Nye A. E., Int. Symp. Chromatogr., Electrophoresis, 5th, 1968, Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1969, p. 486.
47. Hoodless R. A., Pitman K. G., Stewart T. E., Thomson J., Arnold J. E., J. Chromatogr., 54, 393 (1971).
48. Chiang H.-C., J. Chromatogr., 40, 189 (1969).
49. Druding L. F., J. Chem. Educ., 40, 536 (1963).
50. Perkaec J., Perpar M., Kem. Ind. (Zagreb), 12, 829 (1963).
51. Sen N. K., Ghosh P. C., Indian J., Appl. Chem., 33, 357 (1973).
52. Purzycki J., Szwarz A., Owoc M., Chem. Anal. (Warsaw), 10, 485 (1965); Chem. Abstr., 64, 5298e (1966).
53. Verma M. R., Rai J., Int. Symp. Chromatogr., Electrophoresis, 4th, 1966, Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 549.
54. Nakamura G. R., Shimoda S. C., J. Criminal Law, Criminol. Police Sci., 56, 113 (1965).
55. Reiners W., Z. Anal. Chem., 219, 272 (1966).
56. Van Dessel L., Van Regenmortel P., Z. Anal. Chem., 247, 280 (1969).
57. Smalldon K. W., J. Forensic Sci., Soc., 9, 151 (1969).
58. Rettie G. H., Haynes C. G., J. Soc. Dyers Colour., 80, 629 (1964).
59. Kelly J. D., Cantu A. A., J. Assoc. Anal. Chem., 58, 122 (1975).
60. Gaenshirt H., Waldi D., Stahl E., „Synthetic Organic Materials“, in „Thin-Layer Chromatography“, English Ed., E. Stahl Ed., Academic Press, 1965, p. 347. Хроматография в тонких слоях. Под ред. Э. Штала, Перев. с нем. М., Мир, 1965, гл. 17, стр. 346.
61. Stier A., Specht W., Naturwissenschaften, 50, 549 (1963).
62. Horobin R. W., Goldstein D. J., Histochem. J., 4, 391 (1972).
63. Dobres H. L., Moats W. A., Stain Technol., 43, 27 (1968).
64. Loach K. W., J. Chromatogr., 60, 119 (1971).
65. Horobin R. W., Murgatroyd L. B., Histochemie, 11, 141 (1967).
66. Horobin R. W., Histochem. J., 1, 231 (1969).
67. Horobin R. W., Murgatroyd L. B., Stain Technol., 44, 297 (1969).
68. Lansink A. G., Histochemie, 16, 68 (1968).
- 68a. Cramer A. D., Rogers E. R., Parker J. W., Lukes R. J., Am. J. Chin. Pathol., 60, 148 (1973).
69. Tyrer J. H., Eadie M. J., Hooper W. D., J. Chromatogr., 39, 312 (1969).
70. Grossmann H., Wagner H., J. Chromatogr., 35, 301 (1968).
71. Jones G. R. W., J. Chromatogr., 39, 336 (1969).
- 71a. Balogh S., Tamas J., Hegedus-Vajda J., Magy. Kem. Poly., 81, 227 (1975); Chem. Abstr., 83, 125828w (1975).
72. Aliotta G., Roso E., Am. Assoc. Quim. Argent., 59, 437 (1971).
73. Marowski B., Fabricius W., Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 9, 419 (1971); Chem. Abstr., 76, 43543r (1972).
74. Chiang H.-C., Yeh C.-C., T'ai-Wan Yao Hsueh Tsa Chih, 21, 6 (1969); Chem. Abstr., 75, 147554r (1971).
75. Walker R. C., Beroza M., J. Assoc. Off. Agr. Chem., 46, 250 (1963).
76. Druding L. F., J. Chem. Educ., 40, 536 (1963).
77. Pinter G., Kramer M., Parfuem. Kosmet., 50, 129 (1969).
78. Perdiš A., Kem. Ind., 16, 344 (1967); Chem. Abstr., 68, 16069u (1968).
79. Deshusses J., Desbaumes P., Am. Perfum. Cosmet., 83, 37 (1968).
80. Ruedt U., Fette, Seifen, Anstrichm., 71, 982 (1969).
81. Davidek J., Pokorný J., Pokorná V., Cesk. Hyg., 7, 548 (1962).
82. Cotsis T. P., Garey J. C., Drug Cosmetic Ind., 95, 172 (1964).
83. Cotsis T. P., Garey J. C., Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc., 41, 3 (1964).
84. Silk R. S., J. Assoc. Off. Agr. Chem., 48, 838 (1965).
85. Perdiš A., Z. Anal. Chem., 260, 278 (1972).
86. Lehmann G., Rechtenwald U., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 146, 147 (1971).
87. Jork H., Lehmann G., Rechtenwald U., J. Chromatogr., 107, 173 (1975).
88. Brown J. C., J. Soc. Cosmet. Chem., 18, 225 (1967).
89. Hordynska S., Legatowa B., Roczn. Panstw. Zakl. Hig., 20, 673 (1969); Anal. Abstr., 20, 1771 (1971).
90. Kottemann C. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 954 (1966).
91. Takemura I., Bunseki Kagaku, 19, 899 (1970); Anal. Abstr., 22, 229 (1972).
92. Nanjo M., Isohata E., Kano S., Kobayashi N., Eisei Sikenjo Hokoku, 85, 90 (1967); Chem. Abstr., 69, 61494k (1968).
93. Zelazan K., Legatowa B., Roczn. Panstw. Zakl. Hig., 22, 427 (1971); Chem. Abstr., 76, 6623w (1972).
94. Goldstein S., Kopř A. A., Feinland R., Proc. Joint Conf. Cosmet. Sci., 19, 38 (1968).
95. Saenz Lașcano Ruiz I., Laroche C., Bull. Soc. Chim., Fr., 1963, 1594.
96. Latínák J., J. Chromatogr., 14, 482 (1964).
97. Schlegelmilch F., Adbelkader H., Eckelt M., Text. Ind. (Muenchen-Gladbach, West Germ.), 73, 274 (1971).
98. Theidel H., Schmitz G., J. Chromatogr., 27, 413 (1967).

99. Figge K. Fette, Seifen, Anstrichm., 70, 680 (1968).  
 100. Paradiso A. J., Chem. Tech., 1971, 292.  
 101. Menon V. K., Colourage, 17, 38 (1970).  
 102. Rayburn J. A., Arnold L. B., Hoffman J., Lawson W. H., Nettles J. E., Smith A. L., White E., Text. Chem. Color., 1, 58 (1969).  
 103. Sweeny C. D., Am. Dyst. Rep., 61, 70 (1972).  
 104. Brown J. C., J. Soc. Dyers Colour., 80, 185 (1964).  
 105. Meckel L., Milster H., Krause U., Textil-Praxis, 16, 1052 (1961).  
 106. Raban P., Nature, 199, 596 (1963).  
 106a. Logar S., Mesicek N., Perkavec J., Perpar M., Kem. Ind. (Zagreb), 17, 473 (1968); Chem. Abstr., 70, 79120r (1969).  
 106b. Wada K., Shirai L., Okamura H., Hikaku Kagaku, 13, 149 (1958); Chem. Abstr., 68, 88227s (1968).  
 107. Logar S., Perkavec J., Perpar M., Microchim. Acta, 1964, 712.  
 108. Logar S., Perkavec J., Perpar M., Microchim. Acta, 1967, 496, J. Chromatogr., 30, D14 (1967).  
 109. Arsov A. M., Mesrob B. K., Gateva A. G., J. Chromatogr., 81, 181 (1973).  
 110. Takeshita R., Itoh N., Sakagami Y., J. Chromatogr., 57, 437 (1971).  
 111. Gemzova I., Gasparic J., Collect. Czech. Chem. Commun., 32, 2740 (1967).  
 111a. Dousheva M., Arsov A., Kostova V., Mesrob B., J. Chromatogr., 121, 131 (1976).  
 112. Franc J., Hájková M., J. Chromatogr., 16, 345 (1964).  
 113. Franc J., Hájková M., Jehlicka M., Chem. Zvesti., 17, 542 (1963).  
 114. Bansho Y., Saito I., Szuzuki S., Kogyo Kagaku Zasshi 64, 1061 (1961); Chem. Abstr., 57, 4041 (1962).  
 115. Cee A., Sb. Ved. Pr. Vys. S. Chemickotechnol., Pardubice, 1967, 205; Chem. Abstr., 71, 40189 (1969).  
 116. Perkavec J., Perpar M., Z. Anal. Chem., 206, 356 (1964).  
 117. Szuchy L., Mityko J., Gajdacs M., Kolor. Ert., 16, 31 (1974).  
 118. Cee A., Gasparic J., Collect. Czech. Chem. Commun., 33, 1091 (1968); J. Chromatogr., 39, D14 (1969).  
 119. Cee A., Gasparic J., Microchim. Acta, 1968, 452.  
 120. Duscheua M., Jankow L., Dimov K., Melliland Textilber, 56, 147 (1975).  
 121. Schetty G., Helv. Chim. Acta, 45, 809 (1962).  
 122. Schetty G., Helv. Chim. Acta, 45, 1026 (1962).  
 123. Schetty G., Helv. Chim. Acta, 45, 1095 (1962).  
 124. Schetty G., Helv. Chim. Acta, 46, 1132 (1963).  
 125. Schetty G., Helv. Chim. Acta, 52, 1016 (1969).  
 126. Schetty G., Kuster W., Helv. Chim. Acta, 44, 2193 (1961).  
 127. Pollard F. H., Nickless G., Samuelson T. J., Anderson R. G., J. Chromatogr., 16, 231 (1964).  
 128. Toul J., Mouková N., J. Chromatogr., 67, 335 (1972).  
 129. Perkavec J., Perpar M., Microchim. Acta, 1964, 1029.  
 130. Gasparic J., Z. Anal. Chem., 218, 113 (1966); J. Chromatogr., 25, D2 (1966).  
 131. Thielemann H., Microchim. Acta, 1972, 718.  
 132. Hausser H., Arch. Kriminol., 125, 72 (1960).  
 133. Fujii S., Kamikura M., Shokuhin Eisegaku Zasshi, 4, 135 (1963); Chem. Abstr., 60, 9883 (1964).  
 134. Gasparic J., J. Chromatogr., 66, 179 (1972).  
 135. Masschlein-Kleiner L., Microchim. Acta, 1967, 1080; J. Chromatogr., 34, D45 (1968).  
 136. Pastuska G., Trinks H., Chem.-Ztg., 86, 135 (1962).  
 137. Criddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R., J. Chromatogr., 16, 350 (1964).  
 138. De Zeeuw R. A., Anal. Chem., 40, 2134 (1968).

## Глава XXII

## УГЛЕВОДОРОДЫ

В 1952 г. Кирхнер и Миллер [1] разработали методику получения эфирных масел, не содержащих терпенов, разделением на хроматографических полосках, проводимым после обычного хроматографирования. Возможность разработки такого метода подтвердили результаты хроматографического разделения смесей большого числа углеводов и окисленных соединений на тонких слоях кремневой кислоты с применением гексана в качестве элюирующего растворителя. При использовании этого растворителя окисленные соединения оставались на стартовой линии, тогда как углеводороды довольно легко перемещались (табл. 22.1).

Кухарчик и др. [2], используя в качестве растворителей гексан и тетрагидрид углерода, разделили группу соединений, включающую большое число углеводов (табл. 22.2), на слоях как силикагеля, так и оксида алюминия. Положение пятен определяли, опрыскивая пластинки смесью 0,2 мл 37 %-ного раствора формальдегида и 10 мл концентрированной соляной кислоты или 10 %-ным раствором тетрацианэтилена в бензоле либо наблюдая флуоресценцию слоев в УФ-свете. Янак [3, 4], комбинируя тонкослойную хроматографию с газовой хроматографией, провел опыты с рядом углеводов в трех растворителях (табл. 22.2). Разделение он проводил на незакрепленных слоях силикагеля толщиной 0,6—0,9 мм, а в качестве обнаруживающего реагента использовал насыщенный раствор тетрацианэтилена в бензоле. Поскольку слои были незакрепленными, обнаруживающий реагент подавался на пластинку каплями из капиллярной пипетки или пластинку опрыскивали, протирая смоченной им зубной щеткой о металлическое сито. Пятна окрашенных комплексов появлялись после испарения бензола в сушильном шкафу при 100°C.

Огнянов [5] также разделял некоторые из этих соединений на незакрепленных слоях оксида алюминия с активностью по Брокману между I и II, используя гексан в качестве подвижной фазы. Однако этому автору не удалось получить постоянных величин  $R_f$ , так как оксид алюминия был частично дезактивирован из-за адсорбции влаги воздуха при приготовлении хромато-

Таблица 22 I

Величины  $R_f \times 100$  некоторых углеводородов, полученные на хроматографических полосках кремневой кислоты с 5% крахмала в качестве связующего [1]<sup>a, б</sup>

Соединение	$R_f \times 100$	Соединение	$R_f \times 100$
Антрацен	34	$\beta$ -Метилнафталин	49
втор-Бутилбензол	61	Мирцен	56
трет-Бутилбензол	70	Нафталин	35
Камфен	74	Нонен-4	94
Цедрен	82	Октадецен	88
Кумол	62	$\alpha$ -Пинен	83
<i>p</i> -Цимол	38	$\beta$ -Пинен	80
Бициклопентадиен	72	Пирен	27
Бифенил	30	Стильбен	20
Гептен	87	Стирол	55
Гексин	43	Терпинолен	64
Лимонен	41	Ксилол	65
Мезитилен	64		

<sup>a</sup> С разрешения Am. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Слои силикагеля сушили сначала 15 мин при 105°C, затем в течение получаса при 3 мм рт. ст. над пентоксидом фосфора. Растворитель — *n*-гексан, не содержащий примеси бензола; длина пути элюирования 10 см.

графической пластинки и нанесении образца. Такое предположение подтверждается тем, что для некоторых соединений найденные Огняновым величины  $R_f$  совпадают с полученными Кухарчиком и др. [2], а для других различаются. Приведем некоторые величины  $R_f$ , полученные для ряда соединений: *n*-диизопропилбензол 0,89; 3,4,5,11-тетрагидроаценафтен 0,74; аценафтилен 0,49; трифенилметан 0,43 и дифенилметан 0,18. Для того чтобы можно было обнаружить ненасыщенные соединения, Огнянов [6] помещал хроматографическую пластинку на 20 мин в камеру, где содержалось от 10 до 15% озона. После этого он выдерживал пластинку на воздухе, чтобы удалить избыточный озон, и опрыскивал ее раствором индигосульфоновой кислоты (0,13 г индиго нагревали в течение часа с 1 мл концентрированной серной кислоты, а затем разбавляли до 500 мл). После нагревания появлялись пятна белого или от желтого до коричневого цвета на синем фоне.

Таблица 22.2

Величины  $R_f \times 100$  ароматических углеводородов

Углеводород	Силикагель С, диизобутилен [3a]	Смеськагель РНН (незащеленные слои)				Нейтральный $Al_2O_3$ (незащеленные слои, активность I—II)	
		<i>n</i> -Гексан [3]	Циклогексан [3]	<i>n</i> -Гексан [2]	$CCl_4$ [2]	<i>n</i> -Гексан [2]	$CCl_4$ [2]
Нафталин	50	40	59	76	—	85	
1-Метилнафталин	45	46	54	74	55	78	
2-Метилнафталин	44	47	50	87	52	85	
Гексадецилбензол	74						
Додецилбензол	70						
Октилбензол	69						
Гексилбензол	65						
1,3-Диметилнафталин	47	53	50		46	85	
1,4-Диметилнафталин	48	54	54		46	83	
1,5-Диметилнафталин	44	47	54	72			
1,6-Диметилнафталин	45	47	—	75			
1,7-Диметилнафталин	47	52	48	75	39	81	
2,3-Диметилнафталин	40	40	50	72	52	85	
2,6-Диметилнафталин	42	44	48		42	80	
2,7-Диметилнафталин	42	44	53				
1,3,5-Триэтилбензол	65						
Фенилциклогексан	61						
1,2,4-Триметилбензол	60						
1-Пропил-2,4,6-триметилбензол	57						
Пентаметилбензол	53						
2-Этилнафталин							
2,3,5-Триметилнафталин	43	52					
2,4,6-Триметилнафталин	45	47					
1-Этилнафталин	65						
2-Октадецилнафталин							

Углеводород	Силикагель С, дисобутилген [3а]	Силикагель РНН (незакрепленные слои)				Нейтральный $Al_2O_3$ (незакрепленные слои, активность I—II)	
		Силикагель РНН (незакрепленные слои)		CCl <sub>4</sub> [2]	n-Гексан [2]	n-Гексан [2]	CCl <sub>4</sub> [2]
		n-Гексан [3]	Циклогексан [3]				
1-Фенилнафталин	39	—	38	45	74	58	79
2-Фенилнафталин	33	34	45	44			
Бифенил	40	45	44				
4,4'-Диметилбифенил	42	39					
4-Метилбифенил	43						
3-Метилбифенил	42						
Аценафтен	48	52	53	44	83	44	70
Флуорен	38	40	40	32	66	35	73
Дифенилметан	35						
1-Метилфенантрен		29	32				
Антрацен	34	40	42				
2-Метилантрацен	38	40	40				
9-Метилантрацен	38	40					
9,10-Диметилантрацен	38	35	38	32	64	10	65
Пирен	33						
2,3-Бензофлуорен	29						
1,2-Бензофлуорен	29						
1,4-Дифенилбензол	29						
3-Метилпирен	33						
Флуорантрен	31	30	25	29	66	10	55
Хризен	32	18	18	17	11	0	0
3,4-Бензо[а]пирен					65	0	10
Тетрагидронафталин	49						
2,2'-Бинафтил	28						
1,2-Дигидронафталин	46						
9,10-Дигидрофенантрен	35						
Перилен	29						
1,2,4,5-Тетраметилбензол	51			62	76		85

Шульте и др. [7, 8] изучали разделение природных полиацетиленовых соединений на слоях силикагеля. Обнаружение проводилось следующим образом. Пластинки опрыскивали сначала 0,5 %-ным раствором дикоальтоктакарбонила в петролейном эфире (120—135°C) и выдерживали в течение 10 мин, затем опрыскивали 1 н. раствором соляной кислоты и сушили. После обработки неатаном адсорбент отсасывали с подложки и промывали 2 ч, чтобы удалить избыток реагента. Избыточную влагу промокали фильтровальной бумагой, после чего в течение минуты пластинки выдерживали в парах брома, далее погружали в 5 %-ный раствор  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола в смеси уксусной кислоты с водой (1:1) и после этого тщательно промывали 0,5 %-ным раствором аммиака. Хелатные комплексы разделяемых соединений дают красные пятна на почти белом фоне.

Прей и др. [9] разделили хроматографически ряд олефинов с низкими молекулярными массами в виде комплексов с ацетатом ртути (табл. 22.3); разделение велось на слоях силикагеля при элюировании смесью пропанол—триэтиламин—вода (50:25:25). При опрыскивании 2 %-ным спиртовым раствором дифенилкарбазона и последующем кратковременном нагревании при 80°C эти соединения образуют сине-фиолетовые пятна. Браун и Форендоре [10] также пользовались производными ацетата ртути для разделения способных полимеризоваться ненасыщенных соединений. После образования этих производных они удаляли избыток ацетата ртути, добавляя

Таблица 22.3

Величины  $R_f \times 100$  комплексов низших олефинов с ацетатом ртути, полученные на силикагеле со смесью пропанол—триэтиламин—вода (50:25:25) [9]<sup>a</sup>

Олефин	$R_f \times 100$
Этен	7
Пентен-2	22
Пропен	13
Пентен-1	29
Бутен-1	17
Гексен-1	31

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Springer-Verlag.

насыщенный раствор гидразинсульфата; если не проводить этой операции, то ацетат ртути вытекает полосами и образует дополнительное пятно на хроматограмме. На силикагеле пробу элюируют смесью метилэтилкетона, *n*-пропанола, этанола и гидроксида аммония (10:1:4:7) в насыщенной атмосфере. Перед обнаружением пластинки высушивают, выдерживают 5—10 мин в атмосфере паров концентрированной соляной кислоты, после чего опрыскивают 0,1 %-ным раствором дитизона в тетрахлоиде углерода.

Сурьяраман и Кейв [11] разделили методом ТСХ на силикагеле группу длинноцепочечных углеводов ( $C_{10}$ — $C_{16}$ ) и соответствующих спиртов, альдегидов и диолов.

Хирилайнен [12], а также Мэни и Лакшминараяна [13] применили ТСХ для идентификации растительных масел и выявления в них добавок минеральных масел. Редлер и Гринкаревиц [14] определяли минеральное масло, добавленное к сухим фруктам (минеральное масло добавляют иногда к фруктам, чтобы они не слипались). Кригер [15] использовал круговую ТСХ для обнаружения и идентификации минеральных масел, содержащихся в образцах почв.

Бьернот [16, 16а], а также Говард и др. [17] определяли спектрофотометрически многоядерные ароматические углеводороды в пищевых жирах после разделения углеводов методом ТСХ. Разделение можно вести на оксиде алюминия [16] или силикагеле [18] с циклогексаном в качестве растворителя или же на пропитанной диметилформамидом целлюлозе с 2,2,4-триметилпентаном. Этим способом можно обнаружить бензо[а]пирен при его содержании не менее 0,1 мкг/кг. Ченд и др. [19] применили силикагель, пропитанный нитратом серебра, с бензолом в качестве растворителя для обнаружения добавок минеральных масел в растительных маслах. Визуальное наблюдение осуществляли путем нагревания после опрыскивания 50 %-ным раствором фосфорной кислоты в этаноле.

Говард и др. [20] определяли наличие многоядерных углеводов в растворителях, применяемых для экстракции пищевых жиров. Потхаст и Эйгнер [21] разработали метод экстракции пропиленкарбонатом многоядерных ароматических углеводов из копченых мясopодуктов, проводимой перед хроматографированием, а Уайт и др. [22] исследовали многоядерные углеводороды, находившиеся в жидких экстрактах копти. Рорлич [23] определял наличие 3,4-бензопирена в кукурузных хлопьях для завтрака, а Говард и др. [24] определяли содержание многоядерных ароматических углеводов в неразделенных диетических смесях. В последнем случае использовалась дополнительная хроматографическая система: слой ацетата целлюлозы и смесь этанол—толуол—вода (17:4:4).

Гриммер и Дювель [25] исследовали содержание многоядерных циклических углеводов в овощах, злаках и растительных маслах, применяя слой оксида алюминия и смесь циклогексана, изооктанола и ксилола (1:1:1). Дженест и Смит [26] использовали простой метод ТСХ для обнаружения бензо[а]пирена в копченых пищевых продуктах. Говард и др. [27] разработали метод экстракции и определения содержания многоядерных ароматических углеводов в копченых пищевых продуктах и модифицировали [28] предложенный Дженестом и Смитом метод определения бензо[а]пирена таким образом, чтобы нижний предел чувствительности составлял  $0,5 \cdot 10^{-7}$  %. Ри и Брецлер [29] исследовали состав многоядерных углеводов, содержащихся в древесном дыме.

Методом ТСХ определено также содержание ароматических углеводов в сигаретном дыме [30, 31].

Поскольку многоядерные ароматические углеводороды относятся к веществам, существенно загрязняющим атмосферу, Савицкий и др. [32—34] использовали ТСХ для их разделения и идентификации. Как адсорбенты применялись оксид алюминия, целлюлоза, ацетатцеллюлоза и силикагель; лучшими растворителями для этого разделения были смеси воды с диметилформамидом и уксусной или муравьиной кислотой. Уменьшение процентного содержания воды благоприятствовало разделению более легких углеводов, и, наоборот, увеличение процентного содержания воды благоприятствовало разделению более тяжелых углеводов. Наилучшее общее разделение многоядерных ароматических углеводов получено на слоях целлюлозы со смесью диметилформамид—вода (1:1). Пятна обнаруживали по их флуоресценции при УФ-облучении, кроме того, разработан метод количественного анализа с применением спектрофотометрии.

Савицкий и Джонсон [35, 36] разработали основанные на флуоресценции методы идентификации, а Бендер и Савицкий [37] указали пределы чувствительности при использовании концентрированной серной кислоты в качестве обнаруживающего реактива. Элберт и Стэнли [38] получили значения  $R_f$  для бензо[а]пирена и пяти других канцерогенных веществ в 18 различных растворителях. Айкан и др. [39] проводили хроматографическое разделение монометилфлуоренов, а также нескольких 2-замещенных флуоренов. Уиленд и др. [40], Баджер и др. [41] также пользовались ацетилованной целлюлозой в качестве адсорбента при разделении многоядерных ароматических углеводов. Эти авторы применяли водные растворители, например смеси метанол—эфир—вода (4:4:1) и толуол—этанол—вода (4:17:1). Шаад [42] также предпочитает в качестве адсорбента ацетилованную целлюлозу MN 300 AC (степень ацети-

лирования 20%). При элюировании смесью этанол—дихлорметан—вода (20:10:1) получены следующие значения  $R_f$ : бензо[а]пирен 0,32; бензо[б]флуорантрен 0,49; бензо[к]флуорантрен 0,51; бензо[а]антрацен 0,62 и бензо[е]пирен 0,70. Шато и др. [43] использовали смешанный слой из ацетилованной целлюлозы и оксида алюминия (1:2) для двумерного разделения. На первой стадии разделения растворителем служила смесь пентана и эфира (98,5:1,5), на второй — смесь этанола, толуола и воды (17:4:4).

Проблема борьбы с загрязнением воздуха и внимание, привлекаемое канцерогенными веществами, повысили интерес к ТСХ многоядерных ароматических углеводородов, и этой теме посвящены многочисленные публикации. Уайт и Говард [44] приводят величины  $R_f$  20 таких соединений, полученные на целлюлозе, пропитанной диметилформамидом, с применением изоктана в качестве подвижной фазы и на ацетилованной целлюлозе с применением смеси этанол—толуол—вода (17:4:4). Рааэн [45] разделил 9 соединений на смешанном слое, состоящем из авиамид-6 (FMC) и флуороглида 200WTO218 (Chemplast), взятых в соотношении 4:1. Растворителем был *n*-пропанол. Обнаружение разделяемых соединений проводилось визуально при температуре жидкого азота по флуоресценции различных цветов под влиянием УФ-облучения с длиной волны 254 нм [35, 36]. Кифер [46] хроматографировал 11 соединений на слоях неактивированного гидроксида магния, элюируя пробу бензолом. Янак и др. [47, 48] испытали в качестве адсорбентов для этих соединений порошак Q и порошак T (Waters) и ряд растворителей. Риттер и др. [49] получили величины  $R_f$  24 соединений на смешанном адсорбенте, состоящем из бентона 38 и целита (1:1), применяя в качестве растворителя *n*-гептан. Мацушита и Сузуки [50] применяли двухслойные пластинки, в которых один слой представлял собой ацетилованную (26%) целлюлозу, а другой — оксид алюминия. Вначале многоядерные углеводороды хроматографировали на слое оксида алюминия смесью гексан—диэтиловый эфир (19:1), затем пластинку поворачивали на 90° и элюировали пробу смесью метанол—диэтиловый эфир—вода (4:4:1) на слое ацетата целлюлозы. Пьюрифой и др. [51] использовали трехслойную пластинку, полученную из примыкающих друг к другу слоев силикагеля, оксида алюминия и флоризила (в приведенной последовательности). На таких пластинках проводилось разделение моно- и полиядерных ароматических соединений и нефтяных смол. При элюировании смесью циклогексана, этилацетата и бензола (42:1:1), начиная с флоризила (на дне), на флоризиле разделялись смолы, на оксиде алюминия — многоядерные ароматические соединения, на силикагеле — моноядерные.

Петрович [52] разделил многоядерные углеводороды на силикагеле G, применяя в качестве растворителя гептан. Элюирование проводилось раствором пентахлорида сурьмы в тетра-хлориде углерода. Мацушита и др. [53] также использовали слой силикагеля, применив смешанный растворитель, состоящий из *n*-гексана, *o*-дихлорбензола и пиридина (10:1:0,5), для хроматографирования в атмосфере с относительной влажностью 25%. При длине пути хроматографирования 12 см эти авторы получили следующие величины  $R_f$ : антрацен 0,51; пирен 0,41; 1,2-бензантрацен 0,32; 3,4-бензопирен 0,23; перилен 0,19 и 1,12-бензоперилен 0,15. Арро [54] нашел, что на оксиде алюминия можно отделить 1,2-бензантрацен от 3,4-бензопирена, но не удастся получить полного разделения последнего соединения и 1,2-бензопирена. Келер и др. [55] привели таблицу значений  $R_f$ , полученных на оксиде алюминия и на ацетилованной целлюлозе для 15 соединений, в том числе дибензантрацена, бензопирена и др. Эти результаты были использованы в двумерном разделении с применением смешанных слоев, состоящих из 7,5 г ацетилованной целлюлозы и 15 г оксида алюминия. В первом направлении элюирование проводили смесью *n*-гексан—толуол—*n*-пентан (90:5:5), а во втором — смесью метанол—эфир—вода (4:4:1). Павелко и Д'Амброзио [56] использовали циклогексан и пластинки, покрытые оксидом алюминия, для разделения коронена, бензо[ghi]перилена, бензо[а]пирена, бензо[е]пирена, флуорантрена и пирена.

Берг и Лэм [57] исследовали эффективность пропитанных комплексообразующими реагентами адсорбционных слоев оксида алюминия и силикагеля для разделения 21 многоядерного ароматического углеводорода (способ приготовления слоев см т. 1, гл. III, разд. 4). Петролейный эфир, содержащий смесь эфира, пиридин, анилин и тетралин позволяют эффективно выделить кофеин на силикагеле и 2,4,7-тринитрофлуорен на оксиде алюминия. Во многих случаях необходимо многократное элюирование. Пластинки с силикагелем активировали при 120°C в течение 2 ч, а пластинки с оксидом алюминия при 150°C в течение 3 ч.

Франк-Нейман и Джоэссанг [58] использовали силикагель, пропитанный тринитробензолом, для разделения пирена, антрацена, аценафтена, октагидроантрацена и нафталина элюированием пробы циклогексаном. Хризен, ретинен и пимантрен разделялись при добавлении 5% этилацетата к циклогексану. Гарвей и Хелонен [59] хроматографировали 53 ароматических углеводорода на слоях силикагеля, пропитанных 2,4,7-тринитробензолом, пользуясь смесью бензола и гептана (1:4). Шорт и Янг [60] получили хорошие результаты, применяя пиромеллитовый диангидрид для пропитки силикагеля. При этом

образовывались ярко окрашенные и интенсивно флуоресцирующие комплексы. Пробы элюировали циклогексаном. Кесслер и Мюллер [61] применяли пикриновую кислоту в качестве пропитывающего реагента для разделения 21 углеводорода. Элюирующим растворителем служил бензол.

Для количественного анализа смесей ароматических углеводородов используется ряд методов. Наиболее распространены флуоресцентная спектрофотометрия [62—66] или УФ-спектрофотометрия [65—70] элюатов. Элюировать можно бензолом или диэтиловым эфиром. Мацушита и Арашидани [71] предпочитают разделение соединения с тонкого слоя диметилсульфоксида, так как в нем флуоресценция интенсивнее, чем в бензоле. Худ и Уайнфорднер [72] измерили интенсивность флуоресценции 16 многоядерных углеводородов при  $-196^{\circ}\text{C}$  при содержании компонентов порядка 0,1 мкг.

Хантер [73] провел параллельные гравиметрические и прямые денситометрические (после обугливания) определения и установил, что точность определения обоими методами сравнима, за исключением тех случаев, когда не было стандартов; в этих случаях более точным был гравиметрический метод. Для количественных работ применяли также непосредственное флуориметрическое сканирование тонкослойных хроматограмм [74—76]. Предел чувствительности этого метода оценивали в среднем от 0,1 до 0,001 мкг в зависимости от интенсивности флуоресценции [76]. Де Вист и др. [77] комбинировали жидкостную сцинтилляционную спектрометрию с флуориметрией, для того чтобы оценить точность последней. Майер и др. [78] и Джилкрист и др. [79] применили масс-спектрометрию для определения многоядерных ароматических углеводородов, разделенных методом ТСХ.

Инскоэ [80] исследовал фотохимические превращения, совершающиеся в тонкослойных хроматограммах многоядерных ароматических углеводородов. Как оказалось, большинство превращений происходит в результате фотохимических реакций, ускоренных УФ-облучением (с длиной волны 253,7 нм), поэтому, работая с такими соединениями, нужно стремиться свести эти превращения к минимуму. Лэм и Берг [81] обнаружили, что пропитка пластинок кофеином защищает соединения от окисления под действием света. Гейсс и др. [82—85] выполнили ряд исследований с полифенилами, в том числе подробно исследовали влияние влажности в хроматографической камере на достигаемое разделение. Предварительное выдерживание хроматографических пластинок при низкой относительной влажности способствовало разделению терфенилов, а предварительное выдерживание пластинок при высокой влажности — разделению высококипящих полифенилов (см. также т. I, гл. IX). Наиболь-

шую чувствительность при визуальном наблюдении обеспечивает 0,3 %-ный раствор сульфата церия в концентрированной азотной кислоте. Шлитт [86] хроматографировал 12 полифенилов на силикагеле, применяя в качестве растворителя смесь гексана с тетрахлоридом углерода (1:1).

Ламбертсен и Холмен [87] применили тонкослойную и газовую хроматографию для исследования углеводородов, содержащихся в сельдяном жире.

Выделение и определение содержания бифенила в продуктах переработки цитрусовых, выполненное Кирхнером и соавторами [88], описано в т. I, гл. XI, разд. 1 и 12.

Савицкий [89] в общем обзоре, посвященном анализу токсичных веществ, содержащихся в атмосфере, обобщил результаты некоторых работ по ТСХ ароматических углеводородов, а Шаад [90] ввел раздел по ТСХ в свой общий обзор, посвященный хроматографии многоядерных ароматических углеводородов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kirchner J. C., Miller J. M., *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 318 (1952).
2. Kucharczyk N., Fohl J., Vymětal J., *J. Chromatogr.*, **11**, 55 (1963).
3. Janák J., *J. Chromatogr.*, **15**, 15 (1964).
- 3a. Pawlowska-Marzec A., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **13**, 471 (1968); *J. Chromatogr.*, **39**, D1 (1969).
4. Janák J., Klimes I., Hána K., *J. Chromatogr.*, **18**, 270 (1965).
5. Ognyanov I., *Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci.*, **16**, 265 (1963).
6. Ognyanov I., *Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci.*, **16**, 161 (1963).
7. Schulte K. E., *Congr. Sci. Farm., Conf. Comun. Pisa*, **21**, 798 (1961, опубликовано в 1962).
8. Schulte K. E., Ahrens F., Sprenger E., *Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg.*, **108**, 1165 (1963).
9. Prey V., Berger A., Berbalk H., *Z. Anal. Chem.*, **185**, 113 (1962).
10. Braun D., Vorendohre G., *Z. Anal. Chem.*, **199**, 37 (1963).
11. Suryaraman M. G., Cave W. T., *Anal. Chim. Acta*, **30**, 96 (1964).
12. Hygryläinen M., *Farm. Aikak.*, **72**, 161 (1963). *Chem. Abstr.*, **59**, 6623 (1963).
13. Mani V. V. S., Lakshminarayana G., *Indian J. Technol.*, **3**, 416 (1965).
14. Radler F., Grncarevic M. V., *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 266 (1964).
15. Krieger H., *Gas-Wasserfach*, **104**, 695 (1963).
16. Biernoth G., *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **70**, 217 (1968).
- 16a. Biernoth G., *J. Chromatogr.*, **36**, 325 (1968).
17. Howard J. W., Turicchi E. W., White R. H., Fazio T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 1236 (1966).
18. Franzle C., Fritz W., *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **71**, 23 (1969).
19. Chand S., Srinivasulu C., Mahapatra S. N., *J. Chromatogr.*, **106**, 475 (1975).
20. Howard J. W., Fazio T., White R. H., *J. Agric. Food Chem.*, **16**, 72 (1968).
21. Potthast K., Eigner G., *J. Chromatogr.*, **103**, 173 (1975).
22. White R. H., Howard J. W., Barnes C. J., *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 143 (1971).



23. *Rohrlich M.*, Qual. Plant. Mater. Veg., **16**, 334 (1968); Chem. Abstr., **70**, 95509e (1969).
24. *Howard J. W., Fazio T., White R. H., Klimeck B. A.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **51**, 122 (1968).
25. *Grimmer G., Duevel D.*, Z. Naturforsch., **25b**, 1171 (1970).
26. *Genest C., Smith D. M.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **47**, 894 (1964).
27. *Howard J. W., Teague R. T., Jr., White R. H., Fry B. E. Jr.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **49**, 595 (1966).
28. *Howard J. W., White R. H., Frey B. E. Jr., Turicchi E. W.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **49**, 611 (1966).
29. *Rhee K. S., Bratzler L. J.*, J. Food Sci., **33**, 626 (1968).
30. *Schmeltz I., Stedman R. L., Chamberlain W. J.*, Anal. Chem., **36**, 2499 (1964).
31. *Klimisch H.-J., Kirchheim E.*, Chromatographia, **9**, 119 (1976).
32. *Sawicki E., Stanley J. W., Elbert W. C., Pjaff J. D.*, Anal. Chem., **36**, 497 (1964).
33. *Sawicki E., Stanley T. R., Pjaff J. D., Elbert W. C.*, Chemist-Analyst, **53**, 6 (1964).
34. *Sawicki E. T., Stanley T. W., Elbert W. C.*, J. Chromatogr., **18**, 512 (1965).
35. *Sawicki E., Johnson H.*, Microchem. J., **8**, 85 (1964).
36. *Sawicki E., Johnson H.*, Microchim. Acta, **1964**, 435.
37. *Bender D. F., Sawicki E.*, Chemist-Analyst, **54**, 73 (1965).
38. *Elbert W. C., Stanley T. W.*, Chemist-Analyst, **54**, 68 (1965).
39. *Ikan R., Kirson I., Bergmann E. D.*, J. Chromatogr., **18**, 526 (1965).
40. *Wieland T., Lueben G., Determann H.*, Experientia, **18**, 432 (1962).
41. *Badger G. M., Donnelly J. K., Spotswood T. M.*, J. Chromatogr., **10**, 397 (1963).
42. *Schaad R. E.*, Microchem. J., **15**, 208 (1970).
43. *Chatot G., Castegnaro M., Roche J. L., Fontanges R.*, Chromatographia, **3**, 507 (1970).
44. *White R. H., Howard J. W.*, J. Chromatogr., **29**, 108 (1967).
45. *Raen H. P.*, J. Chromatogr., **53**, 600 (1970).
46. *Keefer L. K.*, J. Chromatogr., **31**, 390 (1967).
47. *Martinu V., Janák J.*, J. Chromatogr., **65**, 477 (1972).
48. *Janák J., Kubecová V.*, J. Chromatogr., **33**, 132 (1968).
49. *Ritter F. J., Meyer G. M., Geiss F.*, Pharm. Tijdschr. Belg., **42**, 125 (1965); Chem. Abstr., **63**, 17184h (1965).
50. *Matsushita H., Suzuki Y.*, Bull. Chem. Soc. Jap., **42**, 460 (1969).
51. *Peurifoy P. V., O'Neal M. J., Woods L. A.*, J. Chromatogr., **51**, 227 (1970).
52. *Petrowitz H.-J.*, „Zur Dünnschichtchromatographie Mehrkerniger Aromatischer Kohlenwasserstoffe“ in „Thin-Layer Chromatography“, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 132.
53. *Matsushita H., Suzuki U., Sakabe H.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **36**, 1371 (1963); Chem. Abstr., **60**, 26g (1964).
54. *Arro I.*, Eesti NSV Teaduste Akad. Toimetised Tehniste, Fuusikalis-Mat. Teaduste Seeria, **13**, 47 (1963); Chem. Abstr., **61**, 11946 (1974).
55. *Koehler M., Golder H., Schiesser R.*, Z. Anal. Chem., **206**, 430 (1964).
56. *Pavelko F., D'Ambrosio A.*, Centro Provenciale Per La Studie Sugli Inquinamenti Atmosferici, Amministrazione Provinciale Di Milano, **1959**, 111.
57. *Berg A., Lam J.*, J. Chromatogr., **16**, 157 (1964).
58. *Franck-Neumann M., Joessang P.*, J. Chromatogr., **14**, 280 (1964).
59. *Harvey R. L., Halonen M.*, J. Chromatogr., **25**, 294 (1966).
60. *Short G. D., Young R.*, Analyst (London), **94**, 259 (1969).
61. *Kessler H., Mueller E.*, J. Chromatogr., **24**, 469 (1966).
62. *Koehler M., Eichhoff H. J.*, Z. Anal. Chem., **232**, 401 (1967).
63. *Jaeger J.*, Chem. Zvesti, **21**, 321 (1967).
64. *Pierce R. C., Katz M.*, Anal. Chem., **47**, 1743 (1975).

65. *Sawicki E., Stanley T. W., Elbert W. C., Pjaff J. D.*, Anal. Chem., **36**, 497 (1964).
66. *Borneff J., Kunte H.*, Arch. Hyg. Bakteriologie, **153**, 220 (1969); Anal. Abstr., **19**, 819 (1970).
67. *Stromeberg L. E., Widmark G.*, J. Chromatogr., **49**, 334 (1970).
68. *Chatot G., Dangy-Caye R., Fontanges R.*, Chromatogr., **5**, 460 (1972).
69. *Chatot G., Jequier W., Jay M., Fontanges R.*, J. Chromatogr., **45**, 415 (1969).
70. *Stanley T. W., Morgan M. J., Meeker J. E.*, Anal. Chem., **39**, 1327 (1967).
71. *Matsushita H., Arashidani K.*, Bunseki Kagaku, **24**, 198 (1975); Anal. Abstr., **29**, 5H31 (1975).
72. *Hood L. V. S., Winefordner J. D.*, Anal. Chim. Acta, **42**, 199 (1968).
73. *Hunter L.*, Environ. Sci., Technol., **9**, 241 (1975).
74. *Zawicki E., Stanley T. W., Johnson H.*, Microchem. J., **8**, 257 (1964).
75. *Zawicki E., Stanley T. W., Elbert W. C.*, J. Chromatogr., **20**, 348 (1965).
76. *Tóth L.*, J. Chromatogr., **50**, 72 (1970).
77. *De Wiest F., Rondia D., Fiorentina H. D.*, J. Chromatogr., **104**, 399 (1975).
78. *Majer J. R., Perry R., Reade M. J.*, J. Chromatogr., **48**, 328 (1970).
79. *Gilchrist C. A., Ighes A., Steel G., Whitham B. T.*, Analyst (London), **97**, 880 (1972).
80. *Inscoc M. N.*, Anal. Chem., **36**, 2505 (1964).
81. *Lam J., Berg A.*, J. Chromatogr., **20**, 168 (1965).
82. *Geiss F., Normand M. J.*, NASA, Doc., N63-11764, 19 pp., (1962).
83. *Geiss F., Schlitt H.*, „Analyse von Polyphenylgemischen mit der Dünnschichtchromatographie“, EUR-I-1, Euratom, Brussels, November 1961, 17 pp.
84. *Geiss F., Schlitt H., Ritter F. J., Weimar W. M.*, J. Chromatogr., **12**, 469 (1963).
85. *Ritter F. J., Canonne P., Geiss F.*, Z. Anal. Chem., **205**, 313 (1964).
86. *Schlitt H.*, бельгийский пат. 623751 (April 18, 1963); Chem. Abstr., **61**, 2492 (1964).
87. *Lambertsen G., Holman R. T.*, Acta Chem. Scand., **17**, 281 (1963).
88. *Kirchner J. G., Miller J. M., Rice R. G.*, J. Agric., Food Chem., **2**, 1031 (1954).
89. *Sawicki E.*, „Analysis for Aerotoxicants“, in „Critical Reviews in Analytical Chemistry“, Vol. 1, Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio, 1970, p. 275.
90. *Schaad R. E.*, Chromatogr., Rev., **13**, 61 (1970).

## 1. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПО КЛАССАМ СОЕДИНЕНИЙ

Термин «липиды» охватывает большое количество различных типов соединений, в том числе сложные эфиры, свободные кислоты, простые эфиры, моно-, ди- и триглицериды. Исследуя такую сложную природную смесь, прежде всего целесообразно разделить входящие в нее компоненты на классы. Эту задачу можно выполнить с помощью ТСХ; данному вопросу посвящен ряд обзоров [1—10]. Большинство работ по ТСХ липидов, а таких работ было довольно много, проводили на слоях силикагеля. Для того чтобы разделить на силикагеле неполярные липиды на классы, применяли неполярные растворители, например петролейный эфир, бензол и тетрахлорид углерода, а также их смеси с очень малыми количествами более полярных растворителей, например диэтилового эфира и уксусной кислоты. Выбор растворителя, конечно, зависит от природы смеси, подлежащей разделению. Ниже приводится несколько примеров подбора растворителей, предназначенных для разделения нейтральных липидов.

Кауфман и Висманатан [11] использовали смесь петролейного эфира (35—45°C) и бензола (4:7) и силикагель G. При этом фосфатиды оставались в исходном положении, а за ними в порядке возрастания величин  $R_f$  следовали свободные кислоты, холестерин, триглицериды и эфиры холестерина. Менголд [12] элюировал пробы липидов смесью петролейного эфира (60—70°C) и диэтилового эфира (92:8) и получил хорошее разрешение. Николс [13], исследуя экстракты липидов из салата и капусты, провел предварительное разделение в колонке с кремневой кислотой, элюируя пробу диэтиловым эфиром. Этот растворитель элюирует нейтральные липиды, к которым относятся углеводороды, сложные эфиры стеринов, триглицериды, свободные жирные кислоты, диглицериды и стерины, тогда как полярные липиды (гликолипиды, фосфолипиды и гликозиды) стеринов остаются вверху колонки. Полярные липиды Николс элюировал смесью эфира с метанолом (1:1) и метанолом, после чего разделял нейтральные липиды на кремневой кислоте, применив смесь гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (70:30:1) в качестве элюирующего растворителя. Фо-

гель и др. [14] анализировали липиды сыворотки и использовали смесь петролейного и диэтилового эфиров и уксусной кислоты (60:40:1) для фракционирования нейтральных липидов. Кауфман и Макус [15] четко разделили на классы смесь жирных кислот, кетокислот, моноглицеридов и жирных альдегидов, пользуясь диэтиловым эфиром и пластинками с силикагелем. Те же

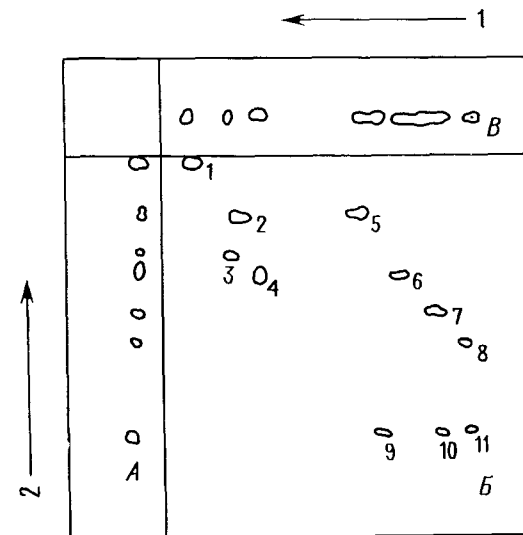


Рис. 23.1. Разделение соединений 11 различных классов [15] (с разрешения авторов и Industrieverlag von Hernhausen K. G.).

A, B, B — стартовые точки (наносится одна и та же смесь, по 3 мкг). Растворители: первое элюирование диэтиловый эфир, второе элюирование изопропиловый эфир+1,5% уксусной кислоты. Длительность элюирования: первое элюирование 30 мин, второе элюирование 45 мин. Обнаруживающий реагент: фосфомолибденовая кислота. Анализируемые соединения: 1 — тристеарилглицерид, 2 — миристиновый ангидрид; 3 — дистеарилглицерид, 4 — стеариловый спирт; 5 — стеариновая кислота, 6 — 9,10-эпокси-стеариновая кислота, 7 — 12 оксистероиновая кислота, 8 — 9,10,12,13 диэпокси-стеариновая кислота; 9 — моностеарилглицерид, 10 — амид стеариновой кислоты, 11 — 9,10-диоксистероиновая кислота.

авторы применяли на том же адсорбенте изопропиловый эфир для разделения смеси триглицеридов, диглицеридов, моноглицеридов и жирных кислот. На рис. 23.1 показана хроматограмма, полученная при разделении 11 различных классов соединений.

Фримен и Уэст [16] применили слой силикагеля G длиной 34 см, с тем чтобы получить такое разделение, которое позволило бы дать количественную оценку. Они проводили ступенчатое хроматографирование. Вначале в течение 60 мин элюировали пробу смесью эфир—бензол—этанол—уксусная кислота (40:50:2:0,3), чтобы разделить холестерин, диглицериды, моноглицериды и фосфолипиды; при этом триглицериды и эфиры

холестерина перемещались вблизи фронта растворителя. Для того чтобы разделить последние, Фримен и Уэст выполняли в течение 100—120 мин второе элюирование в том же направлении смесью эфир—бензол (3:47). Этим методом разделяли также 1,2- и 1,3-диглицериды. Сторри и Такли [17] разделяли липиды этих же классов на хроматографических пластинках такого же размера в устройстве с S-камерой, пользуясь только одной смесью: бензол—эфир—этилацетат—уксусная кислота (40:5:5:0,1). Находившиеся в силикагеле примеси извлекали из него посредством предварительного элюирования метанолом. Келли [18] проводил разделение на 20-сантиметровых хроматографических пластинках силикагеля; вначале при длине пути элюирования 16 см полярным растворителем осуществлялось разделение холестеринных эфиров и триглицеридов. Этот растворитель состоял из петролейного и диэтилового эфиров и уксусной кислоты (70:30:1). В процессе второго элюирования в том же направлении на расстояние 11 см смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир—уксусная кислота (70:30:1) происходило разделение более полярных нейтральных липидов.

Меннерс и др. [19] получили лучшие результаты, элюируя сначала в пределах 6 см от верха пластинки смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир (40—60°C) — уксусная кислота (65:35:0,5), а затем в направлении к верху пластинки смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир (6:94). Пальмер и др. [20] видоизменили первый растворитель Келли, применив на первой стадии двумерного разделения смесь петролейного эфира, диэтилового эфира и уксусной кислоты с соотношением компонентов 75:25:2,5 и использовав тот же растворитель, что и Келли, для разделения во втором направлении. Губман [21] разработал микрометод многостадийного разделения на пластинках размером 45×26 мм; чтобы нанести на эти пластинки адсорбент, их погружали в густую суспензию силикагеля SAMAG D-O в хлороформе. Этим методом удается разделить 1 нг липидного экстракта. Образец наносят в виде пятна размером 1 мм вблизи одного из углов пластинки и элюируют смесью хлороформ—метанол—дважды дистиллированная вода (65:25:4) на расстоянии 1,5 см от верха пластинки; причем сначала элюируют вдоль более длинного ребра пластинки. После этого пластинку высушивают и повторяют элюирование в том же направлении смесью *n*-гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (85:20:2), но на этот раз снизу вверх. Третье элюирование проводят под углом 90° и с тем же растворителем, что и второе. Затем в том же направлении ведут четвертое элюирование, но только на половину пластинки, включающую начальный пункт, причем эту часть изолируют от оставшейся пластинки, соскабливая адсорбент. В то же время удаляют нижний край другой по-

ловины слоя адсорбента, с тем чтобы растворитель не мог контактировать с адсорбентом с этой стороны. Четвертым элюирующим растворителем служит смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1).

Светашев и Васковский [22], проводя хроматографирование на микропластинках, растирали силикагель, как рекомендуют Беленький и др. [23], до частиц размером 2—7 мкм.

Поллак и др. [24] разработали методику многократного элюирования, имеющую ряд преимуществ по сравнению с другими методиками. Добавляя к составным растворителям триметилборат, они практически исключили возможность взаимных превращений 1,2- и 1,3-дипальмитинов и, возможно, 1- и 2-моноглицеридов, которые обычно происходят при разделении на силикагеле G. Кроме того, с помощью метода Поллака и сотрудников можно разделять сложные смеси липидов, содержащие нейтральные липиды, глико- и фосфолипиды. При использовании пластинок с силикагелем G, очищенных предварительным элюированием сначала хлороформом, а затем смесью бензол—этилацетат (5:1), первое основное элюирование проводят на 18 см смесью хлороформ—этанол—триметилборат (100:1:6). После этого пластинки поворачивают на 90° для элюирования во втором направлении смесью бензол—этилацетат—триметилборат (100:20:7,2) при такой же длине пути элюирования. Далее пластинки опять поворачивают на 90°, т. е. на 180° по отношению к положению первого элюирования, и элюируют смесью гептан—бензол (3:2) на 18 см. Четвертое элюирование проводят на 10 см гептаном, предварительно повернув пластинку еще на 90° (т. е. на 180° по отношению к положению при втором элюировании).

Каждый раз между операциями элюирования пластинки сушат 45 мин на воздухе в вытяжном шкафу при комнатной температуре. Этим методом разделили смесь, состоявшую из следующих 13 эталонных липидов: холестерилглюкозид, моногалактозилдиглицерид, 1- и 2-монопальмитины, пальмитиновая кислота, холестерин, 1,2- и 1,3-дипальмитины, трипальмитин, метилпальмитат, холестерилпальмитат, сквален и тетракозан (рис. 23.2. А, Б). Дигалактозилдиглицерид, лецитин и лизолецитин оставались в исходном положении, и, чтобы разделить их или другие фосфолипиды на той же хроматографической пластинке, элюирование в четвертом направлении было заменено на элюирование смесью хлороформ—метанол—вода (70:20:2,5) во втором направлении; предварительно узкую полоску, содержащую фосфолипиды, изолировали путем соскабливания силикагеля (рис. 23.2. В).

Для разделения липидов применяли также градиентные методы [25—27]; они рассматриваются в т. 1, гл. V, разд. 5.

Следует заметить, что, как указывают Дьюти и Аттертон [28], число классов липидов, полученное при данном биологическом экстрагировании, меняется в зависимости от состава исходного продукта и для эффективного разделения методом ТСХ требуется специальный растворитель.

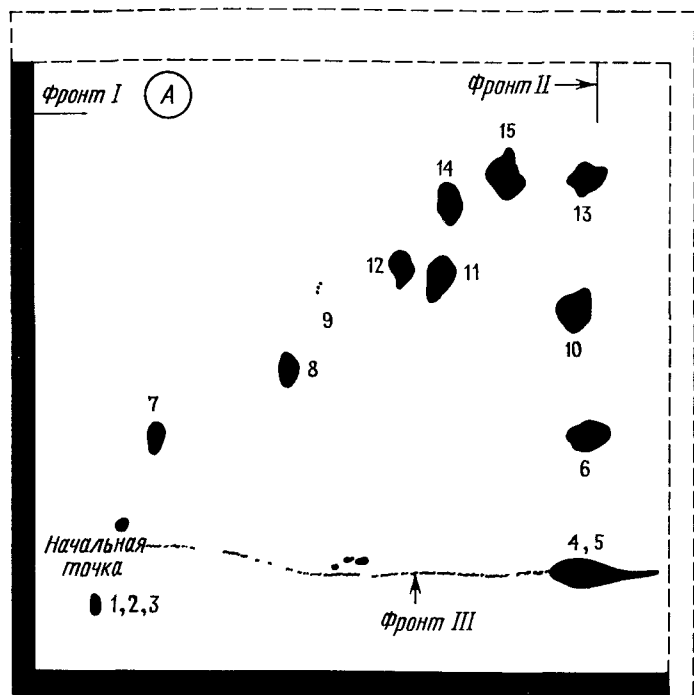


Рис 23 2А Разделение нейтральных липидов, гликолипидов и фосфолипидов при многостадийном элюировании в четырех направлениях Вид пластинки после первого и второго элюирования (см текст) [24] (с разрешения авторов и American Institute of Biological Sciences)

Анализируемые соединения 1 — лизолецитин 2 — лецитин 3 — дигалактозилдиглицерид, 4 — сквален 5 — тетракозан 6 — холестерилпальмитат 7 — моногалактозилтриглицерид 8 — 1 монопальмитат, 9 — 2 монопальмитат, 10 — метилпальмитат, 11 — пальмитиновая кислота 12 — холестерин, 13 — трипальмитилглицерид, 14 — 1 2 дипальмитилглицерид 15 — 1 3 дипальмитилглицерид  
На рисунке также показаны начальная точка и положение фронтов подвижной фазы для первого второго и третьего элюирования

Уэйкер [29, 30] применил очень хорошую методику многостадийного разделения липидов сыворотки. При использовании силикагеля в качестве адсорбента образец элюировали на 3 см смесью пропанол—аммиак (2:1). Растворитель, предназначенный для такого разделения, хранят не более 3 сут, в камере для разделения растворитель предварительно выдерживают

в течение 2 ч, чтобы насытить атмосферу до начала хроматографирования. По окончании разделения хроматограмму освобождают от паров растворителя и вновь элюируют смесью хлороформ—бензол (3·2) на 10 см. Далее поворачивают хроматографическую пластинку на 180° и элюируют при той же

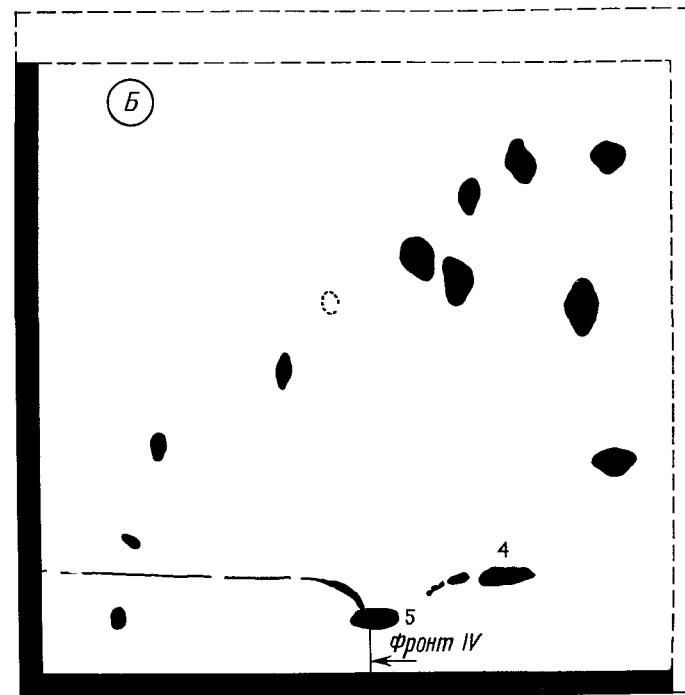


Рис 23 2Б Разделение нейтральных липидов, гликолипидов и фосфолипидов многостадийным элюированием в четырех направлениях [24] (с разрешения авторов и American Institute of Biological Sciences)

Вид пластинки после элюирования в стандартных четырех направлениях Обозначения те же что и на рис 23 2А см также текст

длине пути (10 см) в обратном направлении тетрахлоридом углерода Таким способом разделены эфиры холестерина, свободный холестерин, каротин, группа жирных кислот, лецитин и некоторые неизвестные соединения.

Лаур [31] также пользовался многостадийным разделением для идентификации липидных компонентов, входящих в состав *Rhodymenia palmata*, *Gelidium sesquipedale*, *Lemanea nodosa*. Образцы, нанесенные в виде пятен на хроматографические пластинки с силикагелем, элюировали три или четыре раза в одном и том же направлении смесями гексан—диэтиловый эфир—

уксусная кислота; соотношение компонентов в смеси менялось в пределах от 90:10:1 до 60:40:2, причем концентрация эфира возрастала на каждой последующей стадии элюирования. Целнер и Вольфрам [32] разделяли липиды плазмы смесью петролейного эфира (50—70°C), метилэтилкетона и уксусной

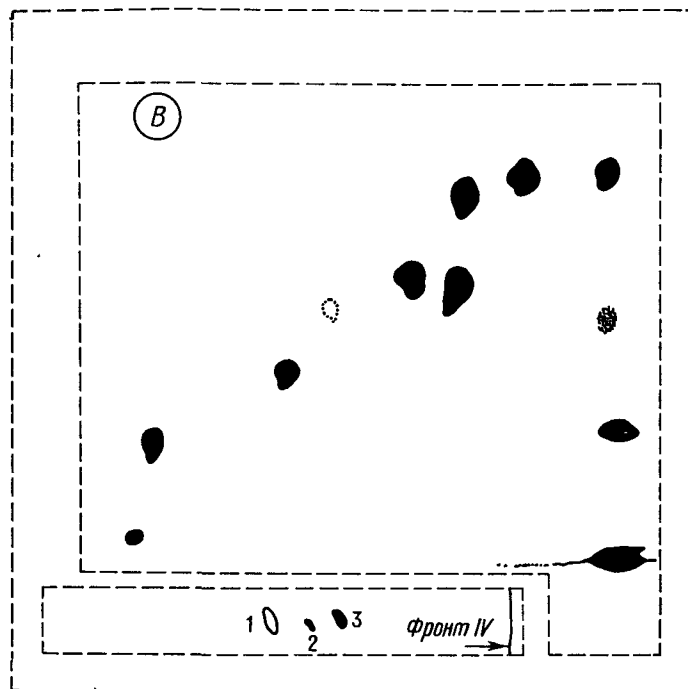


Рис. 23.2В. Разделение нейтральных липидов, гликолипидов и фосфолипидов многостадийным элюированием в четырех направлениях [24] (с разрешения авторов и American Institute of Biological Sciences).

Первые три направления, непомеченные пятна и соответствующие положения фронта элюирования аналогичны приведенным на рис 23.2А. После элюирования в трех направлениях участок хроматограммы с полярными липидами был изолирован вокруг него соскоблили слой силикагеля, после этого провели следующее разделение во втором направлении смесью хлороформ—метанол—вода (70 : 20 : 2,5). Обозначения те же, что и на рис. 23.2А, см также текст.

кислоты (95:4:1); с увеличением концентрации метилэтилкетона в смеси до соотношения 84:15:1 разделение улучшалось.

Араки [33] также применял двустадийное элюирование для разделения липидов сыворотки на силикагеле. Первым растворителем, которым выделяли фосфолипиды, была смесь хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода (25:10:3:2), а вто-

рым растворителем, предназначенным для разделения нейтральных липидов,—смесь гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (165:15:1). Менголд и Малинс [34] разделяли липиды многочисленных жиров, в том числе джоджоба, касторового масла, ойтикового масла, жиров печени акулы и полосатой зубатки и тюленьей ворвани, смесью петролейный эфир (60—70°C)—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90:10:1) на кремневой кислоте. Таким же растворителем, но при соотношении компонентов 70:30:2 разделяли касторовое и оливковое масла.

На рис. 23.3, взятом из статьи Малинса и Менголда [35], показано разделение липидов на классы на кремневой кислоте. Для анализа липидов бычьей спермы Комарек и др. [36] применяли ступенчатое элюирование сначала эфиром, а затем смесью гексан—эфир (9:1). Вацикова и др. [37] разделяли липиды сыворотки на незакопленных слоях оксида алюминия. При элюировании смесью петролейного и диэтилового эфиров (95:5) удается разделить эфиры холестерина и триглицериды, а фосфолипиды, жирные кислоты и холестерин остаются в исходных точках. После удаления двух выделенных фракций с части пластинки над стартовой линией счищают оксид алюминия и наносят на нее свежий слой. После этого проводят элюирование смесью петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (94,5:5:0,5), с тем чтобы разделить свободные жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин. В табл. 23.1 даны

Таблица 23.1

Величины  $R_f \times 100$  фракций липидов, полученные на незакрепленных слоях кислого оксида алюминия (активность по Брокману IV) с различными растворителями [37]

Липиды	Растворители				Выход, а %
	петролейный эфир—эфир (95:5)	петролейный эфир—этанол (98:2)	петролейный эфир—уксусная кислота (94,5:5:0,5)	гептан—уксусная кислота (98:2)	
Холестерин	0	10	35	29	95
Сложные эфиры холестерина	91	87			96
Триглицериды	30	38			102
Жирные кислоты	0	6	47	37	98 <sup>б</sup>
Фосфолипиды	0	0	0	0	102

<sup>а</sup> Выход с оксида алюминия, среднее 5 параллельных опытов.

<sup>б</sup> Средний выход 9 параллельных опытов.

для этих соединений величины  $R_f$ , полученные с различными растворителями, и указан выход.

Лай и Ник [38] применяли тонкие слои, нанесенные на внутреннюю поверхность специальных трубок, для разделения липидов смесями хлороформа с метанолом и гексана с эфиром.

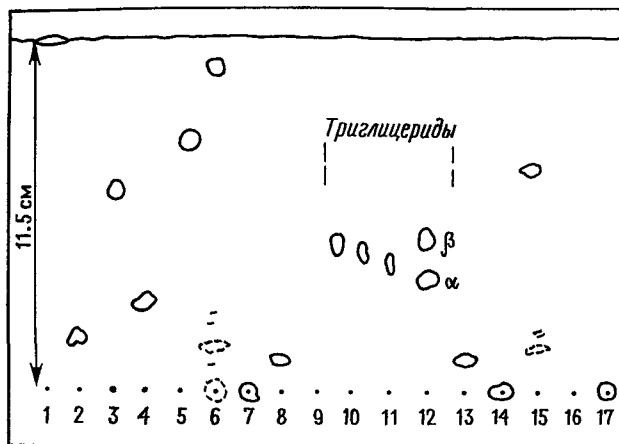


Рис. 23.3. Тонкослойная адсорбционная хроматограмма липидов различных классов, полученная на кремневой кислоте [35] (с разрешения авторов и American Oil Chemists' Society).

Растворитель: смесь петролейный эфир (60—70 °С)—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90 : 10 : 1). Длительность элюирования: 40 мин. Обнаруживающий реагент: 0,2 %-ный раствор дихлорфлуоресцеина в этаноле. Размер пробы: по 20 мкг каждого вещества. Анализируемые соединения: 1 — октадецен-9; 2 — олеиловый спирт; 3 — олеиловый альдегид; 4 — олеиновая кислота; 5 — метилолеат; 6 — холестерилолеат; 7 — моноолеилглицерид; 8 — диолеилглицерид; 9 — триолеилглицерид; 10 — трилинолеилглицерид; 12 — трибутирил(α)-+тритеарил(β)глицерид.

Для быстрого выделения холестерина и триглицеридов из сыворотки Уитнер и др. [39] наносили 20 мкл сыворотки непосредственно на слой силикагеля и элюировали пластинки смесью гексан—эфир—уксусная кислота (80 : 20 : 1,5). Если холестерин не отделялся от других медленно перемещающихся липидов, то применяли более толстый слой адсорбента (0,25 мм) и проводили сначала тройное элюирование на расстояние 5—6 см смесью хлороформ—метанол (2 : 1), а затем растворителем, указанным выше.

## 2. РАЗДЕЛЕНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДОВ

После того как триглицериды выделены методом адсорбционной хроматографии из смеси липидов различных классов, можно приступить к разделению этой группы соединений на от-

дельные компоненты. Для этой цели обычно применяют распределительную хроматографию с обращенными фазами. Кауфман и соавторы [40—42] разделили 20 синтетических триглицеридов и много природных глицеридов. Кизельгур выполнял роль несущего слоя для 5 %-ного раствора тетрадекана в петролейном эфире. Разделение проводили с помощью смеси ацетон—ацетонитрил (4 : 1). При разделении некоторых природных триглицеридов кизельгур пропитывали парафиновым маслом, а в качестве растворителя использовали насыщенную парафиновым маслом смесь ацетона и ацетонитрила (7 : 4). Чтобы разделение было достаточно хорошим, проводили трехкратное элюирование на расстояние 14 см. Описанным способом удалось разделить следующие масла: соевое, кукурузное, арахисовое и льняное. Кукурузное и льняное масла и говяжий жир разделяли на пропитанных силиконом слоях силикагеля. С этой целью силикагель пропитывали силиконом с вязкостью 1,5 сП; элюирующим растворителем служила смесь метанол—ацетонитрил—пропионитрил (5 : 4 : 1,5), которую также насыщали силиконом с вязкостью 1000 сП.

Литчфилд [43] использовал для разделения триглицеридов силанизированный силикагель, пропитанный 8 %-ным раствором гексадекана. Применявшийся как растворитель нитроэтан также насыщали гексадеканом. Перед анализом методом ГХ полученные фракции подвергали гидрогенизации. В результате были получены 30 различных групп триглицеридов. Объединив адсорбционную хроматографию и хроматографию с обращенными фазами, Кауфман и Вессельс [44] исследовали триглицериды, содержащиеся в подсолнечном масле, проводя элюирование вдоль хроматографических пластинок размером 10×40 см. Для адсорбционного разделения эти авторы использовали в качестве адсорбента силикагель, пропитанный нитратом серебра, а в качестве растворителя—смесь бензола и эфира (4 : 1). Предварительное разделение, необходимое для наработки достаточного количества материала, проводилось на адсорбционных слоях толщиной 0,7 мм; в процессе его образцы выделялись в виде полос, а не пятен, так что таким способом можно было разделить до 80 мг липидов. Затем полосы удаляли с пластинок, с тем чтобы провести дальнейшее разделение на отдельные соединения,—на этот раз методом распределительной хроматографии.

Насыщенные триглицериды разделяли на силикагеле, пропитанном тетрадеканом до 80 %-ного насыщения. Применяемую в качестве растворителя смесь ацетон—ацетонитрил также насыщали тетрадеканом. Обнаружение проводили опрыскиванием раствором дихлорфлуоресцеина и затем наблюдали пятна в УФ-свете. Ненасыщенные триглицериды разделяли на силикагеле,

пропитанном парафиновым маслом, элюируя пробу той же смесью, но насыщенной не тетрадеканом, а парафиновым маслом (на 80%). Чтобы улучшить разделение, применяли двух- или трехкратное элюирование. Положение пятен с ненасыщенными соединениями определяли, опрыскивая пластинки сначала иодом, а затем  $\alpha$ -циклодекстрином. Очень эффективно применение пластинок со слоями, пропитанными раствором соли серебра. На таких пластинках разделение идет не только по числу двойных связей, но в соответствии с типом кислотного остатка. Так, Ганстон и Пэдди [45] установили, что разделение триглицеридов происходит в следующем порядке (цифры 0, 1, 2 и 3 показывают число двойных *цис*-связей в цепях жирных кислот): 333, 332, 331, 330, 322, 321, 320, 311, 222, 310, 221, 300, 220, 211, 210, 111, 200, 110, 100 и 000. Де Фриз и Юриенс [46], применив в качестве растворителя смесь бензола и эфира (9:1), нашли, что *транс*-изомеры имеют более высокие значения  $R_f$ , чем соответствующие *цис*-соединения. Положение двойной связи также влияет на величину  $R_f$  [44, 47].

Ренконен и Риккинен [48] обнаружили, что на величину  $R_f$  влияет положение ненасыщенной кислотной группы в триглицериде. Вессельс и Раджагопал [49] показали, что при разделении «критических» пар (а с такими парами приходится сталкиваться при любой методике разделения) наиболее эффективно совместное применение хроматографии с обращенными фазами и адсорбционной хроматографии с адсорбентом, пропитанным солями серебра. Как правило, достаточно 5%-ного насыщения адсорбента нитратом серебра, однако, как установили Моррис и др. [50], в некоторых случаях содержание соли серебра необходимо повысить до 10%. Эти же авторы нашли также, что разделение можно улучшить, если проводить тройное элюирование толуолом при  $-25^\circ\text{C}$ , а для разделения изомеров положения из смеси моноенов они использовали слой с 30%-ным содержанием соли серебра.

Вуд и Снайдер [51], разделяя метиловые эфиры жирных кислот на пропитанных адсорбционных слоях, получили лучшее разделение на слоях, пропитанных аммиачным раствором нитрата серебра. Бернс и др. [52] показали наличие синергического эффекта комплексообразования компонентов растворителя с серебром, способствующего разделению некоторых триглицеридов на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра; некоторые триглицериды, слабо перемещающиеся или вообще не перемещающиеся с циклооктеном, циклогексеном или бензолом, при элюировании смесями бензола с циклическими олефинами перемещаются значительно быстрее.

Барретт и др. [47, 53] использовали для разделения некоторых триглицеридов силикагель, пропитанный 20%-ным раство-

ром нитрата серебра. После образования пятен смесей триглицеридов в результате элюирования хлороформом пластинки элюировали смесью тетрахлорид углерода—хлороформ—уксусная кислота (60:40:0,5), к которой добавляли небольшое количество этанола. Количество добавляемого этанола меняли в зависимости от типа глицерида. При добавлении к растворителю 0,4% этанола можно четко разделить ненасыщенные глицериды, имеющие до трех двойных связей; однако добавка 0,4% этанола не позволяла получить четкого разделения соединений этого типа с большим числом ненасыщенных связей. Увеличивая содержание этанола до 1—1,5%, можно достичь более эффективного разделения ненасыщенных глицеридов.

Де Фриз и Юриенс [54] использовали горизонтальную хроматографию для разделения триглицеридов на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра. Применив бензол как растворитель, они разделили смесь 10 триглицеридов на 7 фракций. К смеси добавляли два красителя, чтобы можно было следить за процессом разделения. Деканальдинитрофенилгидразон дает  $R_f$ , близкое к  $R_f$  глицерилтристеарата, а судановый III содержит два красящих вещества, которые по  $R_f$  соответствуют триглицеридам с одной и двумя двойными *цис*-связями. В этой системе не удалось разделить три пары триглицеридов: СОО+ $\pm$ ЭЭО, ЭЭЭ+СЭО и ССО+СЭЭ (С—стеариновый, О—олеиновый и Э—элаидовый остатки).

Разделению на тонких слоях, пропитанных растворами солей серебра, посвящено много обзоров, в том числе обзоры Бера [55], Юриенса [56], Уэссельса и Раджагопала [49] (более поздний), Морриса [57], в котором рассматриваются работы, опубликованные до 1966 г., и Морриса и Николса [58], охватывающий период вплоть до 1969 г.

Кауфман и Вессельс [44] применили эффективный метод ферментативного расщепления. Согласно этому методу, анализируемые триглицериды подвергаются гидролизу под действием фермента поджелудочной железы, который расщепляет связи в положениях 1 и 3 и не действует на положение 2. Таким образом можно определить, представляет ли триглицеридная фракция один изомер или смесь изомеров. Смесью, полученную после ферментативного расщепления, хроматографируют на силикагеле с диизопропиловым эфиром, содержащим 1% уксусной кислоты, и получают следующие три фракции: исходные триглицериды, диглицериды и жирные кислоты, моноглицериды. Моноглицериды можно подвергнуть дальнейшему гидролизу и определить затем природу жирнокислотного компонента. Ладди и др. [59] также применили этот фермент для исследования образцов, взятых в количествах от 25 до 50 мкг, разделяя продукты реакции посредством тонкослойной хроматографии.

Вольф и Дьюган [60] применили фермент поджелудочной железы для разделения триглицеридов с высокими температурами плавления, извлеченных из пленки, образованной на молекулах глобулами жира. Они нашли, что остатки отдельных жирных кислот распределены в триглицеридах не беспорядочно. Енсен и др. [61, 62] изучали действие концентрированной липазы молока,  $\beta$ -эстеразы, на триглицериды. При кратковременном контакте с ферментом преимущественного его воздействия на длинно- или короткоцепные кислотные остатки, этерифицированные в положениях первичного спирта, не обнаруживается, однако при этом происходит преимущественный гидролиз в положениях первичного эфира.

Слейки и Лендс [63], используя ферментативную реакцию с участием липазы поджелудочной железы и комбинируя тонкослойную хроматографию на обычном силикагеле и на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра, с газохроматографическим определением метиловых эфиров, установили состав жирнокислотных остатков в положениях 1, 2 и 3 при разделении триглицеридов печени крысы. Они нашли, что распределение остатков кислот в положениях 1 и 3 не беспорядочно. Применяя стереоспецифический анализ триглицеридов, Брокерхофф [64] частично разрушал триглицерид метилмагнийбромидом до образования 1,3-диглицерида, который удалось выделить хроматографированием на слоях силикагеля, пропитанных 3 %-ным раствором борной кислоты. Последующее превращение в фосфолипид и обработка фосфолипазой А позволили определить кислотные группы, находящиеся в положениях 1 и 3.

Кауфман и Кое [65] нашли, что при проведении хроматографирования с обращенными фазами полезно использовать в качестве носителя сульфат кальция, потому что в тех случаях, когда слои приходится промывать, силикагель очень часто соскальзывает с хроматографической пластинки. В какой-то степени этому можно воспрепятствовать, обрабатывая силикагель силиконами, однако в некоторых случаях подобная обработка мешает протеканию реакций с образованием окрашенных продуктов и затрудняет последнее удаление дихлордиметилсилана. При разделении триглицеридов слой сульфата кальция пропитывают 5 %-ным раствором тетрадекана в петролейном эфире до 80 %-ного насыщения слоя. Собственно разделение проводят смесью ацетон—ацетонитрил (4:1), а пятна обнаруживают опрыскиванием 0,1 %-ным раствором суданового черного В в 50 %-ном этаноле.

Михалек и др. [66] хроматографировали смеси, содержащие триглицериды олеиновой, линоленовой и линолевой кислот, а также насыщенные триглицериды из различных природных жиров. Разделение проводили на слоях силикагеля, пропитан-

ных парафиновым маслом, с применением уксусной кислоты в качестве растворителя.

Кауфман и др. [65, 67] разделяли критические пары ненасыщенных триглицеридов методом бромирования. Согласно разработанной этими авторами методике, элюирование велось бромированным растворителем. В качестве носителя для пропитываемой фазы (нефтяная фракция с пределами выкипания от 240 до 250°C) эти авторы использовали и кизельгур, и сульфат кальция. Растворитель для разделения с бромированием представлял собой смесь пропионовой кислоты и ацетонитрила, взятых в соотношении 3:2, насыщенную на 80 % промывающей нефтяной фракцией и содержащую 0,5 % брома. На тех же адсорбционных слоях можно разделить предварительно бромированные триглицериды, применяя смесь ацетона с ацетонитрилом (4:1), однако использование бромирующего растворителя для разделения триглицеридов значительно более удобно.

Крелл и Хашим [68] определяли содержание триглицеридов в сыворотке, сочетая ТСХ и ИК-спектроскопию.

### 3. РАЗДЕЛЕНИЕ МОНО- И ДИГЛИЦЕРИДОВ

Малинс [69] исследовал хроматографически алкоксидиглицериды жира печени акулы на слоях кремневой кислоты, элюируя смесью петролейный эфир (30—60°C)—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90:10:1). Полученные таким путем алкоксидиглицериды омыляли и переводили в сложные метиловые эфиры под действием диазометана. Затем метиловые эфиры и эфиры глицерина разделяли с помощью 5 %-ного раствора диэтилового эфира в петролейном эфире. Браун и Джонстон [70] анализировали моно-, ди- и триглицериды на силикагеле, используя в качестве элюирующего растворителя смесь *n*-гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота—метанол (90:20:2:3). Таким способом диглицериды были разделены на две группы: 1,2- и 1,3-изомеры.

Авторы работы [71] смогли разделить моно-, ди- и трипальмитин, элюируя пробу на силикагеле смесью скеллизольва F и эфира (7:3). Однако, чтобы было достаточно места для разделения моно- и диглицеридов, эти две группы соединений элюировали растворителем, содержащим одни и те же компоненты, но в соотношении соответственно 9:1 и 7:3. Приветт и Бланк [72] отделили 1,2-дистеарин от 1,3-дистеарина, используя смесь скеллизольва F и эфира в соотношении 3:2, но оказались не в состоянии разделить 1- и 2-моноглицериды. Однако Рыбичка [73, 74] смог разделить 1- и 2-моноглицериды с помощью метода градиентного элюирования. При использовании этого



метода для разделения глицеридов льняного масла процесс разделения начинают на пластинках с силикагелем, элюируя смесью петролейный эфир (60—80°C)—диэтиловый эфир (9:1) и добавляя по каплям диэтиловый эфир, с тем чтобы состав подвижной фазы постепенно менялся и конечное соотношение компонентов составляло бы 2:3. Такая концентрация диэтилового эфира достигается за 5 мин до окончания элюирования. 2-Моноглицериды остаются при этом на стартовой линии. Кроме 1- и 2-моноглицеридов, таким способом удалось также разделить 1,2- и 1,3-диглицериды.

Йенсен и др. [75] использовали препаративную ТСХ для изучения состава диглицеридов из липолизированных сливок.

Гофман [76] разделял 1- и 2-моноглицериды на тонких слоях оксиапатита при 10°C, используя как элюирующий растворитель метилизобутилкетон. Для этого растворителя он дал типичные значения  $R_f$ : 1-моноглицериды 0,42, 2-моноглицериды 0,59, жирные кислоты 0,78. В отличие от элюирования на слоях силикагеля при хроматографировании на оксиапатите не удается достаточно четко разделить 1,2- и 1,3-диглицериды.

В работе [77] описывается разделение моно- и диглицеридов на силикагеле G, пропитанном борной кислотой.

#### 4. РАЗДЕЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Кауфман и Макус [15] анализировали жирные кислоты на слоях силикагеля, пропитанных ундеканом, элюируя пробы смесями уксусная кислота—вода (24:1) и уксусная кислота—ацетонитрил (1:1). При длине пути хроматографирования 12 см длительность элюирования для двух растворителей составляет соответственно 4 ч и 85 мин. При разделении смеси насыщенных и ненасыщенных кислот Кауфман и др. [65] использовали в качестве носителя сульфат кальция (гипс) и пропитывали его ундеканом; растворителем служила смесь уксусной кислоты и ацетонитрила (1:1). Для разделения критических пар кислот, например лауриновой и линоленовой, миристиновой и линолевой, пальмитиновой и олеиновой, эруковой и арахиновой, эти авторы применяли бромирование и гидрогенизацию. Бромирование велось на слоях сульфата кальция или кизельгура, пропитанных ундеканом [67]. В одном направлении пробу элюировали смесью уксусная кислота—ацетонитрил (3:2), в другом — смесью тех же компонентов, но при соотношении 3:7 с добавкой 0,5 % брома. В ходе элюирования совершалось бромирование ненасыщенных кислот, вследствие чего становилось возможным разделение критических пар.

Возможен и другой метод разделения критических пар. Полоску пластинки, на которой осуществлялось начальное разде-

ление компонентов, опрыскивают 2 %-ным коллоидным раствором палладия, после чего пластинку помещают на час в атмосферу водорода (см. т. 1, гл. VI, разд. 2 и 5). Конечно, перед опрыскиванием палладием пластинку сушат в эксикаторе, чтобы удалить избыток уксусной кислоты, а после восстановления водородом ее сушат при 120°C в течение 15 мин. Ту часть пластинки, которая не обработана палладием, затем наново пропитывали ундеканом перед элюированием таким же растворителем во втором направлении. Это разделение иллюстрирует рис. 6.1 (см. т. 1, гл. VI).

Малинс и Менголд [35] нашли, что смесь уксусной кислоты и воды в соотношении 17:3 достаточно эффективна для разделения кислот  $C_{18}$  на пропитанной силиконом кремневой кислоте. Для разделения кислот с разной длиной цепи использовали смеси уксусной кислоты и воды с различным соотношением компонентов. Разработан очень эффективный метод разделения насыщенных и ненасыщенных кислот. Заключается он в следующем: пробу элюируют на пропитанных силиконом слоях смесью надуксусной и уксусной кислот с водой (2:13:3), при этом ненасыщенные соединения окисляются и образовавшиеся окисленные производные движутся вместе с фронтом растворителя. Малинс и Менголд разработали также методику разделения при пониженных температурах пальмитиновой и олеиновой кислот, которые не удается разделить методом хроматографии с обращенными фазами при обычных температурах. При 4—6°C на пластинках кремневой кислоты, пропитанной силиконом, олеиновая кислота характеризуется  $R_f$  0,1, а пальмитиновая кислота остается на линии старта, если в качестве растворителя пользоваться смесью муравьиной и уксусной кислот с водой в соотношении 2:2:1.

Хейссер [78] использовал смесь диоксан—вода—муравьиная кислота (12:7:1) для разделения нескольких жирных кислот на силанизованном силикагеле. Орд и Бэмфорд [79] силанизовали адсорбционные слои, подвергая их действию паров триметилхлорсилана или гексаметилдисилазана. При различной длительности силанизации (от 1 до 16 ч) они получили разные характеристики разделения в одних и тех же растворителях. С увеличением длительности силанизации уменьшалось число прожилок, наблюдаемых при разделении жирных кислот с длинными цепями. Элюирующим растворителем служила смесь метилциан—уксусная кислота—вода (7:1:2,5). Для разделения жирных кислот, полученных из ископаемых липидов, Дуглас и Пауэлл [80] использовали силикагель, пропитанный 2—3 %-ным раствором гидроксида калия, и смесь эфир—метанол (95:5). Этот растворитель не вызывает гидролиз сложных эфиров, находящихся в экстрактах.

Кауфман и др. [81] смогли разделить критические пары кислот, сложных эфиров и спиртов, применяя низкотемпературную ТСХ с обращенными фазами при программировании температуры.

Мизани [82] выделил очень малые количества неодакановой кислоты (смеси ди- $\alpha$ -разветвленных декановых кислот) из других липидов после их применения в качестве вспомогательного средства при уборке хлопка. Предварительно он экстрагировал водным раствором гидроксида натрия эфирный раствор смеси липидов. Выделенные кислоты, за исключением стерически затрудненной неодакановой кислоты, затем этерифицировали смесью трифторида бора и метанола. После этого выделяли неодакановую кислоту, наносили пробу на тонкий слой силикагеля и элюировали смесью изооктан—ацетон—уксусная кислота (83:15:2).

Уинклер и др. [83], а также Эддисон и Экман [84] применили другой способ выделения свободных жирных кислот, содержащихся в малых количествах в смесях нейтральных жиров. Смесь липидов пропускают через колонку с сефадексом LH-20 (набухает ночь в элюирующем растворителе), элюируя 0,2 %-ным раствором уксусной кислоты в хлороформе. При этом сначала элюируются нейтральные жиры, а вслед за ними жирные кислоты.

### Простагландины

Простагландины — это группа жирных кислот  $C_{20}$ , в молекулах которых содержится циклопентановое кольцо с двумя боковыми цепями; эти гомологи синтезированы *in vitro* из жирных кислот с 18—22 атомами углерода в цепи. Роль этих соединений до сих пор до конца не установлена. Бергстром и др. [85] опубликовали данные об их фармакологических свойствах. Экстракцию и оценку содержания простагландинов следует проводить очень тщательно, так как они могут при этом легко модифицироваться.

Разделяются простагландины на слоях силикагеля. Так, например, простагландины  $A_2$ ,  $B_2$  и  $E_2$  разделяли на слоях силикагеля 60F<sub>254</sub>, применяя в качестве растворителя смесь диэтиловый эфир—метанол—хлороформ (13:3:4), а простагландин  $F_2$  выделили элюированием смесью хлороформ—1,4-диоксан—вода—уксусная кислота (35:60:2:3) [86]. Количественное определение этих соединений проводили посредством спектроденситометрии с прямым ослаблением. Для разделения простагландинов пригодны также следующие смеси: хлороформ—метанол—уксусная кислота (90:5:5 и 80:10:10), бензол—диоксан (5:4) и верхняя фаза системы этилацетат—2,2,4-триме-

тилпентан—уксусная кислота—вода—метанол (22:2:6:20:7). Для разделения простагландинов  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $A_1$  и  $A_2$  применяли также силикагель, пропитанный раствором нитрата серебра, и смеси бензол—диоксан—уксусная кислота (20:20:1) и этилацетат—уксусная кислота—метанол—2,2,4-триметилпентан—вода (11:3:3,5:1:10) [87]. Викрамасингхе и Шоу [88] разделяли простагландины  $A$ ,  $B$  и  $C$ , различающиеся положением двойной связи в молекуле, на слоях силикагеля, пропитанных 10 %-ным раствором хлорида железа(III) в ацетоне. Пластинки с силикагелем погружали в раствор, сушили на воздухе, еще раз погружали, сушили и активировали 90 мин при 100°C. Наилучшее разделение достигалось при элюировании смесью этилацетат—уксусная кислота—гексан (30:1:19).

Для обнаружения простагландинов пригодны реактивы T-195, T-272, T-222, T-146 и T-31 (см. т. 1, гл. V). Кифер и др. [89] обнаруживали эти соединения в субнаномолярных количествах с помощью реактива T-27.

Даниэлс [90] опубликовал обзор работ по хроматографии этих соединений, а Шоу и др. [91] — обзор методов их разделения, идентификации и оценки содержания. Хортон [92] составил по простагландинам большую таблицу.

### 5. РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Кауфман и Ко [93] разделили длинноцепочечные кетокислоты, оксикислоты и лактоны на кизельгуре, пропитанном фракцией минерального масла с температурой кипения 240—250°C. Растворителем служила смесь уксусной кислоты и воды (4:1), насыщенная на 80 % пропитывающей жидкостью. 2-Оксикислоты разделяли в общем в таких же условиях, но только при соотношении компонентов смеси 3:1 и 9:1. Кауфман и Макус [15] анализировали жирные эпоксикислоты и эписульфидокислоты на пропитанном ундеканом силикагеле с 80 %-ной уксусной кислотой в качестве подвижной фазы. Суббарам и др. [94] использовали силикагель, пропитанный силиконовым маслом, для хроматографического разделения жирных эписульфидо- и эпоксикислот смесью ацетонитрил—уксусная кислота—вода (7:1:2).

Малинс и Менголд [35] отделяли гидроксильированные кислоты от негидроксильированных, элюируя пробу растворителем, состоящим из петролейного и диэтилового эфиров и уксусной кислоты (70:30:1). Суббарам и Ахая [95] описали методику разделения нескольких близких по структуре изомеров положения оксистеариновой кислоты и соответствующих спиртов и эфиров (табл. 23.2) на слоях силикагеля G. Кислоты и спирты элюировали смесью диэтилового эфира и легкого

Таблица 23.2

Величины  $R_f \times 100$  оксистеариновых кислот, спиртов и сложных эфиров, полученные на силикагеле G [95]<sup>a</sup>

Положение оксигруппы в молекуле изомера оксистеариновой кислоты	Кислоты <sup>б</sup>	Спирты <sup>б</sup>	Метиловые эфиры <sup>в</sup>
6	36	22	32
7	39	26	37
8	43	30	40
9	45	31	45
10	50	35	50
12	56	40	55
18	40	28	37

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

<sup>б</sup> Растворитель: смесь легкого петролейного и диэтилового эфиров (3:2) с добавкой 2 %-ной уксусной кислоты.

<sup>в</sup> Растворитель: смесь легкого петролейного и диэтилового эфиров (3:1) с добавкой 2 %-ной уксусной кислоты.

петролейного эфира (2:3) с добавкой 2 % уксусной или муравьиной кислоты. При разделении метиловых эфиров соотношение компонентов в растворителе меняли до 1:3, в этом случае также добавляли 2 % кислоты. Суббарао и др. [96] применили этот метод к большой группе кислородсодержащих жирных и сложных эфиров.

Руми и др. [97] изучали разделение группы очищенных жирных кислот, их эфиров и спиртов методом прямой ТСХ и ТСХ с обращенными фазами. Для прямой хроматографии использовали силикагель G, а для ТСХ с обращенными фазами — пластинки, пропитанные силиконовым маслом (силиконовая жидкость Dow Corning 200). Адсорбент пропитывали, элюируя его 5 %-ным раствором силиконового масла в эфире. Полученные величины  $R_f$  приведены в табл. 23.3. Те же исследователи [98] хроматографировали эпокси-, окси-, галогенокси- и кетопроизводные жирных кислот на слоях силикагеля, пропитанных борной кислотой, применяя различные смеси диэтилового эфира с легким петролейным эфиром в качестве растворителей. Одновременно они сравнивали результаты, полученные при разделении прямой хроматографией на силикагеле и хроматографией с обращенными фазами. эритро- и трео-Диокси- и тетраоксипроизводные жирных кислот лучше разделялись на слоях, пропитанных борной кислотой. Автор работы [99] разработал

Таблица 23.3

Величины  $R_f \times 100$  некоторых жирных кислот, а также соответствующих сложных эфиров и спиртов, полученные на слоях силикагеля G [97]<sup>a</sup>

Длина цепи	Характеристика соединения	Тривиальное название кислоты	Кислота		Метиловый спирт		Спирт			
			5 % эфира — петролейный эфир	Ацетонитрил — уксусная кислота — вода (7:1:2) <sup>б</sup>	2 % эфира — петролейный эфир	Ацетонитрил — уксусная кислота — вода (7:1:2) <sup>б</sup>	Ацетонитрил — уксусная кислота — вода (7:1:2) <sup>б</sup>	(7:3)	(8:2)	(9:1)
	Положение насыщенной связи									Уксусная кислота — вода

## Соединения ацетиленового ряда

22	13, 14	Бегеноловая	43	40	60	14	64	21	7	15	28
18	9, 10	Стеароловая	34	64	58	39	61	38	18	26	43
18	6, 7	Тарировая	34	62	58	40	61	38	18	26	43
11	10, 11	Ундециновая	19	87	39	81	39	71	44	55	61

## Соединения этиленового ряда

22	13, 14	Эруковая	52	20	74	7	58	15	3	9	18
18	9, 10	Олеиновая	41	50	73	29	54	28	12	18	34
18	6, 7	Петроселиновая	41	52	73	30	54	28	12	18	34
11	10, 11	Ундеценовая	26	75	57	70	34	55	34	44	51
18	9, 10; 12, 13	Линолевая		62		40	54	38	18	26	43
18	9, 10; 12, 13; 15, 16	Линоленовая		71		50	54	48	23	35	53

## Насыщенные соединения

22	Нет	Бегеновая	52	3	74	0	58	0	0	0	4
18	"	Стеариновая	45	40	71	14	54	21	7	15	28
11	"	Ундекановая	28	66	57	60	34	38	26	32	38
20	"	Арахидиновая	52	20	71	7					
16	"	Пальмитиновая	44	50	73	29		28	12	18	34
14	"	Миристиновая	44	64	73	39		38	18	26	43
9	"	Пеларгоновая	28	75	59	70					
12	"	Лауриновая		71		50		48	23	35	53

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

<sup>б</sup> Разделение методом хроматографии с обращенными фазами.

микрометод определения геометрической конфигурации эпокси-групп. Несколько миллиграммов эпоксисоединения, в данном случае *цис*- или *транс*-метил-9,10-эпоксистеарата, растворенных в 0,5 мл бензола, взбалтывают 30 мин с 10-кратной навеской амберлита XN-1005 (H<sup>+</sup>) (фирмы Rohm a. Naas). *трео*-Диол, образовавшийся из *цис*-изомера, и *эритро*-диол, образовавшийся из *транс*-изомера, можно затем легко разделить на силикагеле, пропитанном борной кислотой.

Моррис и др. [100] использовали смесь петролейного и диэтилового эфиров (9:1) с добавкой 1%-ной уксусной кислоты для разделения вицинально ненасыщенных оксикислот на слоях силикагеля. Соответствующие метиловые эфиры разделяли с тем же растворителем, но без уксусной кислоты. Моррис и др. [101, 102] применили ТСХ для обнаружения и оценки содержания эпокси- и оксикислот в природных продуктах. Разделение метиловых эфиров проводили на силикагеле в смесях диэтилового и петролейного (35—45°C) эфиров; методом многостадийного элюирования смесями с переменным соотношением этих двух составных частей растворителя можно разделить компоненты смеси по классам, выделяя каждый раз один класс соединений.

Сгоутас и Куммеров [103] разделили на силикагеле несколько пар диокси- и тетраоксипроизводных стеариновой кислоты (табл. 23.4) смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота (45:5:1).

Таблица 23.4

Величины  $R_f \times 100$  ди- и тетраоксистеариновых кислот, полученные на силикагеле G со смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота (45:5:1). Длина пути элюирования 10 см [103]<sup>a</sup>

Кислота	$R_f \times 100$
<i>трео</i> -9, 10-Диоксистеариновая	70
<i>эритро</i> -9,10-Диоксистеариновая	65
<i>трео,трео,трео</i> -9,10,12,13-Тetraоксистеариновая	48
<i>трео,эритро,трео</i> -9,10,12,13-Тetraоксистеариновая	44
<i>эритро,трео,эритро</i> -9,10,12,13-Тetraоксистеариновая	40
<i>эритро,эритро,эритро</i> -9,10,12,13-Тetraоксистеариновая	35

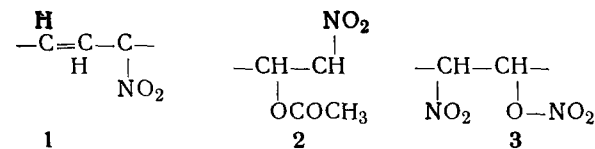
<sup>a</sup> С разрешения авторов и American Oil Chemists' Society.

Хейссер [78] анализировал на силанизованном силикагеле гидроксаматы жирных кислот; подвижная фаза представляла

собой смесь метанола, диоксана, хлороформа и глицинового буферного раствора с pH 3,0, взятых в соотношении 4:3:1:4, Хроматографирование велось в камере с ненасыщенной атмосферой; обнаружение проводилось реактивом Т-118.

Базан и Целлик [104] использовали слой с градиентом толщины для разделения и количественной оценки содержания свободных жирных кислот и других липидов. Этот метод позволяет выделять из сложных смесей соединения, содержащиеся в следовых количествах.

Малинс и др. [105, 106] изучали возможность разделения и идентификации жирных спиртов, оксифиров, глицеридов и эфиров глицерина в виде нитратов (способы получения этих производных см. в т. 1, гл. XIV, разд. 2). Моно- и динитраты оксисоединений можно отделить от соединений других классов посредством хроматографии на тонких слоях кремневой кислоты, элюируя пробу гексаном. Для разделения нитратов оксифиров, глицеридов и эфиров глицерина требуется более полярный растворитель, например смесь *n*-гексан—диэтиловый эфир (85:15). Эфиры глицерина, которые нельзя отделить от моноглицеридов с такой же длиной цепи [34], удается разделить в виде нитратов. Малинс и Хаул [107] нитровали метилолеат тем же реагентом, которым успешно нитруют алкены [108]. При этом образуются производные трех типов: изомерные нитросоединения (1), ацетонитросоединения (2) и нитронитраты (3):



Эти соединения можно разделить на кремневой кислоте смесью петролейного (30—60°C) и диэтилового эфиров (85:15).

Менгольд и Каммерек [109] анализировали промышленную смесь синтетических производных жирных кислот, содержащих азот, серу или фосфор. В эту смесь входит широкий набор соединений, в том числе первичные, вторичные и третичные амины, меркаптаны, тиоцианаты, алкилфенолы, изоцианаты, соединения четвертичного аммония и поверхностно-активные реагенты. Для многостадийного разделения этих соединений на слоях силикагеля пригодны четыре растворителя: смесь петролейный эфир (60—70°C)—бензол (95:5); бензольный слой, образовавшийся при приведении в равновесие 100 мл бензола с 10 мл нормального раствора гидроксида аммония при 20°C; хлороформный слой, образовавшийся при приведении в равновесие 10 мл хлороформа с 1 мл нормального раствора гидроксида аммония,

взятый в смеси с метанолом в соотношении 97:3, и смесь ацетона с 14 н. раствором гидроксида аммония в соотношении 9:1. Более сильные кислотные соединения, используемые в качестве поверхностно-активных реагентов (алкилсульфаты, сульфонаты, фосфаты и т. п.), можно разделить на слоях силикагеля (содержащего 10 % сульфата аммония), элюируя смесью хлороформ—метанол с добавкой 5 % 0,1 н. серной кислоты. Точные соотношения компонентов зависят от полярности соединений, причем соотношение хлороформа и метанола меняется в типичных смесях от 97:3 до 4:1.

#### 6. РАЗДЕЛЕНИЕ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Малинс и Менголд [35] анализировали хроматографически сложные метиловые эфиры, выделенные из сельдяного жира, на слоях, пропитанных силиконом, элюируя пробу смесью ацетонитрил—уксусная кислота—вода (14:2:5). Метиловые эфиры с 18 атомами углерода разделяли 85 %-ной уксусной кислотой также на слоях силикагеля, пропитанных силиконом. В работе [110] описан способ разделения насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров, предусматривающий окисление ненасыщенных кислот; элюирование в этом случае проводят смесью надуксусной и уксусной кислот и воды (2:15:3). Эпплуайт и др. [111] разделили метиловые эфиры на хроматографических полосках силикагеля G, применяя различные смеси растворителей (табл. 23.5).

Хэммондс и Шоун [112] применили распределительную хроматографию с обращенными фазами для разделения критических пар метиловых эфиров. При этом адсорбционные слои кизельгура пропитывали 10 %-ным раствором жидкого парафина в петролейном эфире (60—80°C). Растворитель для пропитки полностью испаряли при комнатной температуре, а затем вводили метиловые эфиры в виде растворов в петролейном эфире. Элюирование проводили смесью нитрометан—ацетонитрил—уксусная кислота (15:2:2) на расстоянии 10 см. В этом случае раствор не приводили в равновесие с неподвижной фазой. Обнаружение проводили реактивом Т-123, под воздействием которого пятна насыщенных и ненасыщенных соединений окрашиваются в различные цвета. Описанным методом можно отделить метиллиноленат от метиллаурата и метиллинолеат от метилмиристата. Метилолеат удается отделить от метилпальмитата лишь частично.

Орд и Бэмфорд [79] также применяли хроматографию с обращением фаз для разделения метиловых эфиров. Они использовали слой силикагеля, силанизированный триметилхлорсиланом или гексаметилдисилазаном, причем связанные метильные

Таблица 23.5

Величины  $R_f \times 100$  некоторых метиловых эфиров жирных кислот, полученные на хроматографических полосках, покрытых силикагелем G. Длина пути элюирования 10 см [111]<sup>a</sup>

Соединение <sup>б</sup>	Скеллизолев F — диэтиловый эфир			Бензол — диэтиловый эфир		Бензол — метанол (17:3)
	(9:1)	(7:1)	(1:1)	(3:1)	(1:1)	
Метилпальмитат	62	89				
Метилстеарат	60	89		95	97	81
Метилолеат <sup>в</sup>	56	89				
Метиллинолеат <sup>в</sup>	58	88				
Метиллиноленат <sup>в</sup>	57	87				
Метилэлеостеарат <sup>в, г</sup>	49 <sup>д</sup>	82 <sup>д</sup>				
Метил-9-оксистеарат		43				
Метил-12-оксистеарат		50			87	45
Метил-9-окси-10, 12-октадекадиеноат <sup>в, г</sup>		43	67		84	41
Метилрицинолеат <sup>в</sup>		49	72			45
Метил-12-кетостеарат		83			94	55
Метил-9-кето-10, 12-октадекадиеноат <sup>в, г</sup>		61				

<sup>a</sup> С разрешения авторов и American Oil Chemists' Society.

<sup>б</sup> Индикатор—2,7-дихлорфлуоресцеин.

<sup>в</sup> Второй индикатор — флуоресцеин с бромом.

<sup>г</sup> Вызывает гашение флуоресцирующих минералов.

<sup>д</sup> Основное пятно; отмечены также небольшие примеси.

группы образовали обращенную фазу. Растворителем служила смесь ацетонитрил—уксусная кислота—вода (7:1:2,5). Применяв адсорбционный слой того же типа, Хейссер [78] разделял метиловые эфиры смесью ацетон—метанол—вода (7:5:3,5). В обоих случаях пятна обнаруживали опрыскиванием этанольным раствором фосфомолибденовой кислоты с последующим нагреванием.

Русева-Атанасова и Янак [113] разделяли метиловые эфиры по числу углеродных атомов методом газовой хроматографии на неполярной неподвижной фазе и осаждали элюат на тонком слое силикагеля, пропитанного раствором нитрата серебра (т. е. объединили ГХ и ТСХ). При последующем элюировании смесью петролейного и диэтилового эфиров (7:3) происходило разделение сложных эфиров по степени ненасыщенности. Метиловые эфиры для газохроматографического анализа получить довольно быстро и просто: перэтерификацию проводят непосредственно на пластинке для ТСХ [114, 115]. После нанесения образца на слой силикагеля или после первоначального элюирования слой опрыскивают 2 н. раствором метилата натрия. Перэтерификация заканчивалась за 5 мин, и в указанных условиях расщепляются только сложноэфирные, а не кислотно-амидные связи.

Моррис [116] продемонстрировал эффективность адсорбционных слоев, пропитанных нитратом серебра, при разделении ненасыщенных метиловых эфиров методом ТСХ. Длинноцепочечные метиловые эфиры, так же как *цис*- и *транс*-моноэтановидные эфиры, легко разделяются на таких слоях по степени ненасыщенности. Эфиры диоксикислот анализируют также на слоях, пропитанных борной кислотой, с тем чтобы разделить *трео*- и *эритро*-изомеры; на необработанном силикагеле сделать это не удается. На пластинках, пропитанных как борной кислотой, так и нитратом серебра, можно проводить одновременное разделение изомеров и винилогов (рис. 23.4). Моррис [117] распространил эту методику на эфиры жирных длинноцепочечных ди-, три- и тетраоксикислот. Он испытал ряд комплексообразующих реагентов и нашел, что наилучшие результаты дают борная кислота, борат и арсенит натрия. На силикагеле, пропитанном 10 %-ным раствором одного из этих реагентов, четко разделяются диастереоизомерные пары метиловых диоксиэфиров, причем во всех случаях *трео*-изомер с меньшей температурой плавления характеризуется более высоким  $R_f$ . Разделение триоксифиров на слоях, пропитанных борной кислотой и боратом натрия, оказалось не слишком эффективным, однако хроматографирование на соответствующих слоях, пропитанных арсенитом натрия, позволило обнаружить некоторое различие между *трео*- и *эритро*-изомерами и дифференцировать по четыре диастереоизомера 9,10,12- и 9,12,13-триоксистерарата. При разделении тетраоксисоединений на силикагеле, пропитанном раствором арсенита натрия, более высокоплавкие изомеры также характеризовались большими величинами  $R_f$ . Пропитка слоев раствором бората натрия в данной ситуации дает в некоторых случаях лучшие результаты, чем пропитка раствором нитрата натрия. Например, *эритро*-9,10-*эритро*-12,13-тетраоксистерари-

новая кислота имеет на слое с арсенитом натрия такую же величину  $R_f$ , что и соответствующий *трео*-9, 10-*эритро*-12,13-изомер, однако эти соединения удается разделить на слое, пропитанном раствором бората натрия. При разделении этих соединений в качестве растворителей используют смеси метанола и хлороформа. Для диоксипроизводных соотношение этих компонентов равно

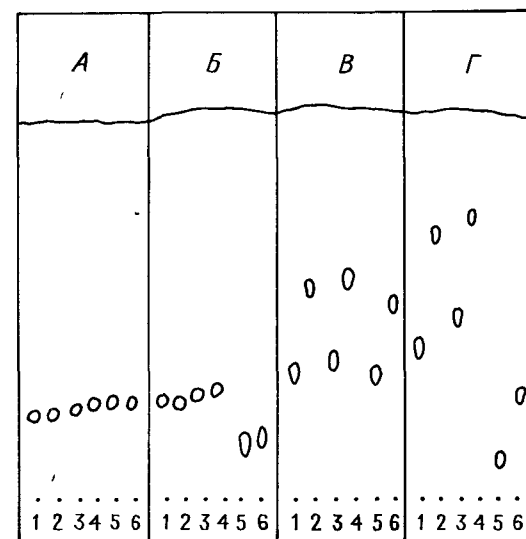


Рис. 23.4. Тонкослойная хроматограмма смеси метиловых эфиров на силикагеле [116] (с разрешения авторов и Society of Chemical Industry).

Адсорбент силикагель: А — необработанный; Б — пропитанный нитратом серебра; В — пропитанный борной кислотой; Г — пропитанный нитратом серебра и борной кислотой. Элюирующий растворитель: смесь диэтиловый эфир—гексан (60 : 40). Положения пятен определяли в УФ-свете после опрыскивания 2,7-дихлорфлуоресцеином и воспроизвели копированием.  
Анализируемые соединения: 1 — *эритро*-9,10-диоксистерат; 2 — *трео*-9,10-диоксистерат; 3 — *эритро*-12,13-диоксистерат; 4 — *трео*-12,13-диоксистерат; 5 — *эритро*-12,13-диоксистерат; 6 — *трео*-12,13-диоксистерат.

2 : 98, для триоксипроизводных, разделяемых на слоях, пропитанных арсенитом натрия, оно составляет 1 : 99, а для тетраоксипроизводных — 1 : 24. Для разделения тетраоксипроизводных на слоях, пропитанных боратом натрия, применяют смесь с соотношением компонентов 1 : 9. Де Фриз и Юрриенс [46] анализировали различные геометрические изомеры на силикагеле, пропитанном нитратом натрия. Метиловые эфиры ненасыщенных жирных кислот элюируют смесью бензол—петролейный эфир с соотношением компонентов от 7 : 3 до 9 : 1.

Моррис и др. [50] нашли возможность улучшить разделение изомерных *цис*- и *транс*-октадеценатов на слоях, пропитанных

нитратом серебра (30 %): они применили трехкратное элюирование толуолом при  $-25^{\circ}\text{C}$ . Вуд и Снайдер [51], чтобы улучшить разделение метиловых эфиров, проводили его на слоях, пропитанных аммиачным раствором нитрата серебра.

Бергельсон и др. [118] разделяли изомерные метиловые эфиры моноолефиновых кислот методом двумерной хроматографии. Первое элюирование проводили на силикагеле, пропитанном додеканом, смесью ацетон—ацетонитрил (7:10). После этого пропитывали неиспользованную часть пластинки раствором нитрата серебра и элюировали в другом направлении смесью диэтилового и петролейного эфира (9:41).

Авторы работы [119] модифицировали этот метод, с тем чтобы обеспечить возможность полного структурного анализа сложных смесей жирных кислот, основываясь на двумерном разделении их метиловых эфиров и последующей идентификации ненасыщенных кислот с помощью окислительного расщепления непосредственно на слое адсорбента. Таким способом удается определить как позиционные изомеры, так и стереоизомеры ненасыщенных жирных кислот. Предназначенные для двумерного разделения слои силикагеля, закрепленные гипсом, пропитывают, погружая их в 10 %-ный раствор додекана в гексане. После нанесения образца смеси метиловых эфиров проводят элюирование в первом направлении, используя растворитель Кауфмана и Макуса [15], т. е. смесь ацетонитрил—ацетон (1:1), на 90 % насыщенную додеканом. После элюирования пластинку сушат 30 мин при комнатной температуре, 30—40 мин при  $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$  и выдерживают  $\sim 12$  ч при комнатной температуре. Ту часть пластинки, на которую после второго элюирования должны попасть метиловые эфиры ненасыщенных кислот, пропитывают, опрыскивая 20 %-ным раствором нитрата серебра (ту часть, где должны были находиться насыщенные метиловые эфиры, не обрабатывают из-за пониженной чувствительности обнаруживающего реагента на слоях, обработанных нитратом серебра). После обработки солью серебра пластинку сушат: постепенно в течение часа нагревают до  $100^{\circ}\text{C}$  и выдерживают еще час при этой температуре. После элюирования во втором направлении смесью дипропиловый эфир—гексан (2:3) пластинки сушат 20 мин при  $70\text{--}80^{\circ}\text{C}$ .

Насыщенные метиловые эфиры обнаруживают, опрыскивая пластинки раствором 40 мг бромтимолового синего в 100 мл 0,01 н. раствора гидроксида натрия. (Примечание: ту часть пластинки, где должны находиться ненасыщенные эфиры, не опрыскивают этим реактивом.) После 10—15-минутного нагревания при  $70\text{--}80^{\circ}\text{C}$  появляются на синем фоне желтые пятна насыщенных эфиров. Ненасыщенные метиловые эфиры обнаруживают опрыскиванием раствором 40 мг бромтимолового синего

в 100 мл 20 %-ного раствора гидроксида аммония. Эти соединения дают быстро блекнущие светло- или темно-синие пятна на сером фоне. Для дальнейшей идентификации ненасыщенных кислот путем окислительного расщепления их метиловых эфиров приготавливают пластинки со слоем порошкообразной целлюлозы с добавкой гипса в качестве связующего. Слой целлюлозы пропитывают 25 %-ным раствором ДМФ в бензоле и сушат 20 мин при комнатной температуре и затем несколько минут при  $60\text{--}70^{\circ}\text{C}$ . Приготовленную пластинку накрывают стеклом, чтобы не дать испариться пропитываемому соединению. С пластинки с силикагелем, на которой уже провели разделение, ненасыщенные метиловые эфиры элюируют эфиром, элюат концентрируют и наносят в виде пятна на пластинку с целлюлозой. Окисляют ненасыщенные соединения непосредственно на этом пятне смесью 10 мл 0,1 М раствора метапериодата и 10 мл раствора 0,1 М как по карбонату, так и по перманганату калия. Реакцию ведут при  $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$  до тех пор, пока не исчезает розовая окраска, характерная для перманганата калия. Чтобы окисление прошло полностью, эту процедуру повторяют. Образовавшиеся щелочные соли переводят в свободные кислоты, добавляя каплю 2 н. соляной кислоты. Полученные кислоты элюируют смесью гексан—диэтиловый эфир—диметилформамид (40:20:1). Продукты окисления (монокарбоновые кислоты и монометиловые эфиры дикарбоновых кислот) обнаруживают, выдерживая пластинки в парах аммиака и опрыскивая смесью 200 мг метилового красного, 200 мг бромтимолового синего, 100 мл формалина, 400 мл этанола и 3 мл однонормального раствора гидроксида натрия. Кислоты дают желтые пятна на зеленом фоне. Эфиры арахидоновой и более высокомолекулярных кислот окисляют непосредственно на пластинке с силикагелем, продукты реакции экстрагируют эфиром и наносят на пластинку с целлюлозой. Образующиеся при окислении *n*-алкановые кислоты, содержащие более 11 углеродных атомов в молекуле, перемещаются по слою целлюлозы вместе с фронтом растворителя. Их идентифицируют, проводя реакцию окисления на тонких слоях силикагеля, пропитанных додеканом, и элюируя продукт окисления смесью ацетонитрила с уксусной кислотой (4:1), насыщенной додеканом. После сушки в течение часа при  $110\text{--}120^{\circ}\text{C}$  монокарбоновые кислоты обнаруживают опрыскиванием 10 %-ным раствором фосфомолибденовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием. В этом случае реакцию окисления необходимо проводить дважды: один раз на силикагеле для окисления монокарбоновых кислот и второй раз на целлюлозе для идентификации монометиловых эфиров дикарбоновых кислот. В табл. 23.6 приведены  $R_f$  метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а в табл. 23.7 даны  $R_f$

Таблица 23.6

Величины  $R_f \times 100$  метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, полученные двумерным хроматографированием на пропитанном силикагеле [120]<sup>a</sup>

Соединение	Первое направление б	Второе направление в
Метиловые эфиры насыщенных кислот:		
додекановой	78	80 г
тетрадекановой	67	80 г
гексадекановой	56	80 г
октадекановой	46	80 г
эйкозановой	36	80 г
докозановой	28	80 г
Метиловые эфиры ненасыщенных кислот:		
C <sub>16</sub>		
цис-гексадецен-9-овой	71	39
цис-гексадецен-11-овой	71	46
C <sub>18</sub>		
цис-октадецен-7-овой	60	43
цис-октадецен-9-овой	60	42
цис-октадецен-11-овой	60	51
транс-октадецен-9-овой	60	64
C <sub>20</sub>		
цис-эйкозен-11-овой	50	52
C <sub>22</sub>		
цис-докозен-5-овой	40	39
цис-докозен-11-овой	40	52
C <sub>26</sub>		
цис-гексакозен-9-овой	25	47
октадекадиен-9,12-овой	71	8
октадекатриен-9, 12, 15-овой	80	3
эйкозатетраен-5,8,11,14-овой	89	0

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

<sup>б</sup> Растворитель: смесь ацетонитрил—ацетон (1:1), насыщенная на 90 % додеканом. Адсорбент: силикагель, закрепленный гипсом на пластинке и пропитанный 10 %-ным раствором додекана в гексане.

<sup>в</sup> Растворитель: смесь дипропиловый эфир—гексан (2:3). Адсорбент: силикагель, пропитанный 20 %-ным раствором нитрата серебра.

<sup>г</sup> Пропитка нитратом серебра не проводилась; см. текст.

монокарбоновых кислот и монометиловых эфиров дикарбоновых кислот, полученные на слоях целлюлозы, пропитанных ДМФ. На рис. 23.5 показано разделение продуктов окислительного расщепления некоторых ненасыщенных кислот.

Таблица 23.7

Величины  $R_f \times 100$  монокарбоновых кислот и монометиловых эфиров дикарбоновых кислот, полученные на целлюлозе, пропитанной ДМФ, со смесью гексан—диэтиловый эфир—ДМФ (40:20:1) [119]<sup>a</sup>

Соединение	$R_f \times 100$
Монокарбоновые кислоты:	
пропионовая	20
масляная	31
валериановая	43
капроновая	54
энантовая	65
пеларгоновая	84
ундекановая	94
Монометиловые эфиры дикарбоновых кислот:	
глутаровой	11
пимелиновой	17
азелаиновой	31
нонандикарбоновой	54

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

Верещагин и Скворцова [120] хроматографировали метиловые эфиры на пропитанном 2 % додекана силикагеле; элюентом служил раствор нитрата серебра и додекана в 70—90 %-ном водном растворе метанола. Орд и Бэмфорд [121] также пользовались растворителями, содержащими нитрат серебра, для разделения метиловых эфиров жирных кислот и глицеридов на силанизированных слоях силикагеля (способ приготовления см. в т. 1, гл. III, разд. 7). Разделение на слоях, обработанных дихлорсиланом, проводили в необлицованной камере 10 %-ным водным раствором метанола, насыщенным нитратом серебра, или насыщенной нитратом серебра смесью вода—метанол—ацетонитрил (2,5:95:2,5). На слоях, обработанных диэтилдихлорсиланом, пробу элюировали смесью вода—метанол—нитро-



метан (2,5:95:2,5) или 10 %-ным водным раствором ацетона, причем оба раствора предварительно насыщали нитратом серебра.

Паулозе [122] после пропитки слоев силикагеля 5 %-ным раствором силиконовой жидкости Daw Corning 200 опрыскивал эти слои 10 %-ным раствором нитрата серебра в 50 %-ном этаноле. Перед нанесением образца пластинки сушили 15 мин при 105°C. Элюирование проводили 95 %-ным водным метанолом,

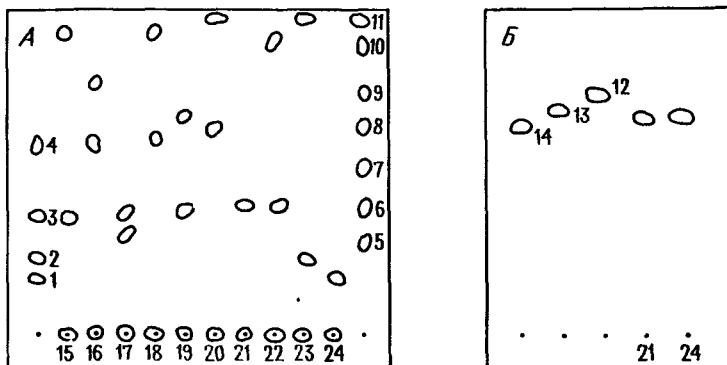


Рис. 23.5. Окислительное расщепление ненасыщенных жирных кислот [120] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.).

*А* — адсорбент: целлюлоза, пропитанная 25 %-ным раствором ДМФ в бензоле; растворитель смесь гексан—диэтиловый эфир—ДМФ (40:20:1); длительность элюирования: 20 мин. *Б* — адсорбент: силикагель, пропитанный 10 %-ным раствором додекана в гексане; растворитель смесь уксусная кислота—ацетонитрил (1:4), насыщенная додеканом; длительность элюирования: 60 мин  
**Эталонные вещества.** Монометиловые эфиры кислот: 1 — глутаровой; 2 — пимелиновой; 3 — азелановой; 4 — нонан-1,9-дикарбоновой. Кислоты: 5 — пропионовая; 6 — масляная; 7 — валериановая; 8 — капроновая; 9 — энантовая; 10 — пелларгоновая; 11 — ундекановая; 12 — пальмитиновая; 13 — маргариновая; 14 — стеариновая.  
 Метиловые эфиры ненасыщенных кислот, подверженные окислению: 15 — олеиновой; 16 — *цис*-вакценовой; 17 — линоленовой; 18 — *цис*-эйкозен-11-овой; 19 — линолевой; 20 — *цис*-докозен-11-овой; 21 — *цис*-гексакозен-9-овой; 22 — элаидиновой; 23 — *цис*-октадецен-7-овой; 24 — *цис*-докозен-5-овой.

насыщенным силиконовой жидкостью и нитратом серебра. В таких условиях можно разделить ненасыщенные эфиры с одинаковой длиной цепи и различным числом двойных связей, например олеат, линолеат и линоленат, и насыщенные эфиры, различающиеся по длине цепи на два углеродных атома. Описанным способом разделены следующие критические пары: линолеат и мирикат, олеат и пальмитат. Позиционные изомеры эфиров, например олеат и петроселинат, разделить не удалось, хотя *цис*- и *транс*-изомеры, олеат и элаидат в этих условиях разделяются. К числу критических пар, которые не удалось разделить, относятся линоленат и рицинолеат, олеат и лаурат, элаидат и мирикат, эрукат и пальмитат.

Манголд и др. [123] использовали радиоактивный diazometan для приготовления метиловых эфиров с целью их последующего применения при количественном анализе липидов. Получали эти эфиры следующим образом. Раствор 10 мг (0,05 ммоль) *n*-толилсульфонилметил-<sup>14</sup>C-нитрозамида (удельная активность 0,6 мКи/ммоль) в 1 мл диэтилового эфира взаимодействует в микрогенераторе газа с 2 мл охлажденного льдом раствора 0,1 г гидроксида натрия в смеси этанол—вода (10:1). Diazometan и эфир отгоняют из реакционной смеси, пропуская через помещенную в баню с водой реакционную колбу при 60—70°C медленный ток азота. Раствор diazometana в эфире собирают по очереди в два приемника, в каждый из которых предварительно помещают 1—2 мл эфира. Чтобы температура в приемнике не поднималась выше 0—5°C, его погружают в воду со льдом. По окончании перегонки растворы diazometana сливают вместе. Пробы эфира с растворенным diazometаном (по 0,5—1 мл) сразу вводят в растворы, содержащие от 2 до 20 мг жирных кислот (0,01—0,1 ммоль) в смеси диэтиловый эфир—метанол (90:10) [124, 126]. Липиды (по 10—20 мг), содержащие гидроксильные или аминные группы, метят реакцией с 1:10 раствором уксусного <sup>14</sup>C-ангидрида (CH<sub>3</sub><sup>14</sup>CO)<sub>2</sub>O (удельная активность 0,6 мКи/ммоль) в пиридине. Реакцию ведут с 20 %-ным избытком реагента в запаянной трубке размером 5/150 мм в течение 30—60 мин при 100°C. После охлаждения трубку вскрывают и разбавляют реакционную смесь 10 мл однонормальной серной кислоты; ацетилированные липиды экстрагируют эфиром, промывают водой и сушат. Полученные радиоактивные соединения используют также при проведении очистки различных липидов.

Манголд и Каммерек [126] описали методику применения ртутных, ацетокси- и метоксипроизводных метиловых эфиров для разделения последних методом ТСХ. Поскольку этот метод применяют в сочетании с ГХ, сначала удаляют метиловые эфиры гидроксилсированных кислот, чтобы воспрепятствовать взаимодействию некоторых из них при разделении методом ГХ. Синтезируют эти производные по методу, предложенному Янценом и Андреасом [127, 128].

Около 25 мл реагента — раствора ацетата ртути (14 г) в метаноле (250 мл), воде (2,5 мл) и ледяной уксусной кислоте (1 мл) — смешивают с образцом смеси эфиров (1 г) и выдерживают в закрытой пробкой колбе в темноте при комнатной температуре. Через 24 ч метанол испаряют в вакууме или в токе азота при температуре не выше 30°C и растворяют сухой остаток в хлороформе (50 мл). Раствор промывают водой (5 раз по 25 мл), чтобы удалить остатки ацетата ртути, и сушат сульфатом натрия, после чего смесь производных наносят

на тонкие слои кремневой кислоты и подвергают многостадийному элюированию. Для отделения метиловых эфиров от ацетокси- и метоксипроизводных ненасыщенных метиловых эфиров применяют смесь петролейного (60—70°C) и диэтилового эфиров (4:1). Высушенные пластинки элюируют при длине пути 12—14 см смесью *n*-пропанол—уксусная кислота (100:1). Этим способом четко разделяют моно-, ди- и триеноаты. Выделенные производные можно наблюдать в виде пурпурных пятен на светло-розовом фоне после опрыскивания 0,1 %-ным раствором *симм*-дифенилкарбазона в 95 %-ном этаноле.

Уайт [129] применял для разделения эфиров ненасыщенных жирных кислот метокси- и бромртутные аддукты, поскольку при этом достигалось лучшее разделение. Эти производные он получал при 30-секундном взбалтывании раствора ацетокси-, ртутных и метоксипроизводных в хлороформе с раствором бромида натрия в метаноле (5:95, масса:объем), взятым с 10 %-ным избытком. После обработки водой хлороформный слой отделяли и промывали, после чего его можно было наносить на тонкослойную пластинку. Полученные производные наносили на силикагель G и элюировали смесью гептан—диоксан (60:40). Минникин и Смит [130] сравнивают эффективность использования соответствующих хлор-, иод- и бромпроизводных. В виде производных последних двух типов ненасыщенные эфиры можно фракционировать по числу и стереохимии двойных связей и отчасти по длине цепи. Для разделения на силикагеле пригоден растворитель, состоявший из гексана и диэтилового эфира (9:1).

Приветт и др. [131—133] использовали восстановительный озонолиз метиловых эфиров для анализа и определения структуры ненасыщенных жирных кислот. Эта методика предусматривает количественное и очень быстрое образование озонидов в тщательно контролируемых (чтобы уменьшить долю побочных реакций) условиях и каталитическое восстановление озонидов с образованием альдегидов. Озонирование проводили следующим образом. Раствор озона получали барботированием кислорода, содержащего 2—3 % озона, в течение 5 мин со скоростью около 100 мл/мин через 10 мл пентана, помещенного в круглодонную колбу емкостью 25 мл; колбу предварительно погружали в баню с сухим льдом, чтобы температура в ней составляла от —60 до —70°C. По окончании барботирования раствор приобретал темно-синюю окраску и содержал около 0,3 ммоль озона. Озонирование проводили, добавляя к 10 мл приготовленного раствора 1—50 мг пробы, растворенной в 2—3 мл очищенного пентана, предварительно охлажденного до самой низкой из возможных температур, чтобы не вызвать кристаллизацию пробы. Проводя озонирование других эфиров,

следует помнить, что 10 мл раствора озона достаточно для озонирования 50 мл метилолеата. Образование бесцветного раствора по окончании озонирования показывает, что необходимо дополнительно ввести озон, чтобы придать раствору бледно-синеватую окраску. Появление бледно-серой окраски говорит о завершении реакции. Можно использовать ТСХ для контроля за полнотой озонирования, применяя на слоях силикагеля смесь петролейного (30—60°C) и диэтилового эфиров (98:2). Восстановление озонидов проводили водородом с помощью катализатора Линдлара; если в молекулярной цепи продуктов восстановления не менее пяти углеродных атомов, то восстановление может идти в среде пентана. Если же образуются более короткие фрагменты, надо заменить пентан на метилкаприлат или подобное соединение с большим временем удерживания при газохроматографическом анализе. Продукты восстановления анализировали методами ИК-спектроскопии, ГХ и ТСХ. Такая же методика используется для анализа проб ультрамикроскопического масштаба [134]. Определяя положение двойных связей в эфирах полиеновых жирных кислот, Рем и Приветт [135] проводили частичное восстановление гидразином и последующий восстановительный озонолиз по описанной методике.

Кауфман и др. [81, 136] разделяли критические пары метиловых эфиров, а также свободных кислот и жирных спиртов, применяя изотермическое хроматографирование с обращенными фазами при низкой температуре, а также программирование температуры.

Каннан и др. [137] разделили карбоксиметилтиопроизводные, образующиеся при взаимодействии меркаптоуксусной кислоты с мононенасыщенными кислотами и эфирами. Разделение проводили на силикагеле G со смесями диэтилового эфира и легкого петролейного эфира (2:3) и ацетонитрила, уксусной кислоты и воды (7:1:2). Пятна обнаруживали обугливанием серной кислотой.

Градек и Меншик [138] применяли тонкие слои суспензированной смеси мочевины и целита 545 (120 меш), взятых в соотношении 3:1, в метаноле, насыщенном мочевиной. Слой сушили примерно 12 ч при комнатной температуре. На таких слоях удается разделить метиловые эфиры кислот с разветвленными и неразветвленными цепями. После нанесения образца хроматографическую пластинку выдерживают примерно 12 ч в парах метанола, с тем чтобы образовались клатратные соединения. Элюирование проводят петролевым эфиром. Эфиры разветвленных жирных кислот дают  $R_f$  от 0,4 до 0,5; производные неразветвленных кислот остаются вблизи фронта растворителя.

Бейдингс [139] показал, что на процесс разделения метиловых эфиров положительно влияет отсутствие кислорода в атмосфере. Целесообразно также добавлять антиоксидант к растворителю, используемому для разделения метиловых эфиров или других липидов. Врен и Щепановска [140] добавляют к элюирующему растворителю 0,005 % 4-метил-2,6-ди-*трет*-бутилфенола. Нейдерфер и Ли [141] предпочитают пользоваться 1,4-диокси-2-*трет*-бутилбензолом в качестве антиоксиданта.

Корнелиус и Шоун [142] разделяли метиловые эфиры кислот, полученные при омылении масла семян *Bombax oleaginum*. Метилирование проводили по методу Меткалфа и Шмитца [143], т. е. путем 5-минутного кипячения в колбе с обратным холодильником с 12,5 % -ным раствором трифторида бора в метаноле. Эфиры разделяют на силикагеле, пропитанном нитратом серебра.

Дхонешваркар и Мид [144, 145] обнаружили метиловые эфиры в тканях трупов. Кауфман и Висванатан [146] также нашли метиловые и этиловые эфиры среди липидов печени пациента-алкоголика, умершего от пневмонии. Количество эфиров первичных спиртов можно сопоставить с содержанием алкоголя в крови.

Файерстон [147] анализировал мономерные, димерные и полимерные метиловые эфиры методом адсорбционной хроматографии и хроматографии с обращением фаз. Рихе и др. [148] и Приветт и Бланк [149] исследовали самоокисление метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот, которое в некоторых случаях приводит к образованию полимеров. Рихе и соавторы разделили и идентифицировали производные соединений с малой молекулярной массой. Приветт и Бланк изучали начальные стадии самоокисления и нашли, что формированию устойчивых гидроперекисей предшествует образование промежуточных кислородных соединений. Если специально удалять гидроперекись, то можно синтезировать высокоустойчивые полиненасыщенные кислоты. Приветт и Никкель [150] получили метиловые эфиры высокой степени чистоты методом хроматографии с обращенными фазами на колонке, используя для последующей очистки ТСХ.

## 7. РАЗДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ, СФИНГОЛИПИДОВ И ГЛИКОЛИПИДОВ

Поскольку соединения этой группы полярны, для элюирования и разделения их на слоях силикагеля необходим полярный растворитель, например широко используемая смесь хлороформ—метанол—вода с различным соотношением компонентов (от 65:25:4 [151—154] до 60:35:8 [32, 152]). Фогель и др. [14] применяли эту смесь с соотношением компонентов 80:25:3

для разделения фосфолипидов сыворотки, а Николс [13] использовал такую же смесь для разделения фосфолипидов и гликолипидов, полученных из листьев салата и капусты. Кроме того, Николс проводил разделение с такими смесями, как изобутилкетон—уксусная кислота—вода (40:25:3,7), хлороформ—метанол—7 н. раствор гидроксида аммония (12:7:1), хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода (65:25:8:4) и хлороформ—метанол—уксусная кислота (65:25:8). Висванатан [155] успешно разделил липиды *Tetrahymena pyriformis* на 10 полярных компонентов, пользуясь смесью хлороформ—метанол—концентрированный аммиак (65:35:5) на силикагеле G. Поль и др. [156] предложили новый состав растворителя для разделения гликолипидов, фосфолипидов и нейтральных липидов на слоях силикагеля, а именно смесь ацетон—бензол—вода (91:30:8).

Кунц и Козин [157] разработали более сложный, но эффективный растворитель для разделения фосфолипидов: они добавляли к смеси органических компонентов небольшие количества различных неорганических солей. Этот растворитель состоял из следующих компонентов: 32 мл хлороформа; 26 мл *n*-бутанола; 2,5 мл *n*-пропанола; 5,5 мл этанола; 9,4 мл метанола; 10,5 мл ледяной уксусной кислоты; 0,70 мл 4 %-ного (масса/объем) раствора бикарбоната натрия; 0,25 мл 7 %-ного (масса/объем) раствора карбоната натрия; 0,06 мл 15 %-ного (масса/объем) раствора хлорида аммония; 0,05 мл 3 %-ного (масса/объем) раствора гидроксида лития; 0,3 мл 0,9 %-ного (масса/объем) раствора карбоната лития; 0,3 мл этилацетата; 0,3 мл концентрированного аммиака; 0,05 мл 20 %-ного (масса/объем) раствора хлорида цезия; 0,15 мл 15 %-ного (масса/объем) раствора карбоната калия; 0,05 мл 10 %-ного (масса/объем) раствора бромид калия; 0,13 мл 2,5 %-ного (масса/объем) раствора фторида натрия; 0,12 мл 12,5 %-ного (масса/объем) раствора хлорида рубидия; 0,08 мл 22 %-ного (масса/объем) раствора ацетата марганца; 0,05 мл 1,5 %-ного (масса/объем) раствора хлорида ртути(III), 0,20 мл «ацетата цинка» (2 г ацетата цинка растворяют в 40 мл дистиллированной воды и 1 мл уксусной кислоты) и 0,016 мл «ацетата магния» (1,5 г оксида магния растворяют в 25 мл воды и 21,5 мл кислоты). Эту смесь необходимо готовить непосредственно перед употреблением. Адсорбент представлял собой смесь 38,5 г силикагеля H и 4,5 г силикагеля G. Пластинки после сушки на воздухе активировали 2—3 ч при 115°C. При одномерном элюировании были получены 18 отдельных фракций. Курри и Нинфо [158] использовали смесь хлороформ—метанол—вода (14:6:1) для разделения фосфолипидов, полученных из экстрактов различных тканей.

Курри и др. [159—161] применяли эту же смесь также для выделения фосфолипидов непосредственно из тканей, минуя промежуточную стадию экстракции. Для этого срезы тканей наносили на покровные стеклышки микроскопа, которые в свою очередь закрепляли на хроматографических пластинках с помощью гуммиарабика или сыворотки Апати. Пластинки с закрепленным образцом покрывали силикагелем G и сушили в эксикаторе. Подобным же образом наносили в виде суспензии на стеклянную бумагу митохондрии крысиной печени, предварительно тщательно промытые в растворе сахарозы. Нанесенное пятно затем вырезали и закрепляли с помощью капли элюирующего растворителя на предварительно приготовленной пластинке с силикагелем. Разделение фосфолипидов при этом было такое же, как и разделение их экстракта.

К смеси хлороформ—метанол—вода добавляли уксусную кислоту.

Скипский и др. [162, 163] применяли смесь хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода (65:25:8:4) при разделении на пластинках с нейтральным силикагелем и ту же смесь с соотношением компонентов 50:25:8:4 на пластинке со щелочным силикагелем. На пластинках щелочного силикагеля, полученного обработкой 0,01 M раствором карбоната или ацетата натрия, эти авторы смогли отделить фосфатидилсерин от других фосфолипидов. На пластинках с нейтральным силикагелем, приготовленных с применением сульфата кальция в качестве связующего, наблюдался «эффект нагрузки» фосфатидилсерином, т. е. величина  $R_f$  зависела от количества нанесенного вещества. Этот эффект можно устранить, используя слои силикагеля (САМАГ) без связующего или же пластинки с щелочным силикагелем.

Нильсен [164, 165] исследовал эффект нагрузки и нашел, что кислотные фосфолипиды, например, кардиолипин и фосфатидилинозит, ведут себя при хроматографировании по-разному в зависимости от валентности металла, образующего с ними соль. Липиды животных содержат соли как одно-, так и двузарядных металлов, и это следует иметь в виду при выборе растворителя—кислотного или нейтрального. Нильсен рекомендует промывать раствор липида (в органическом растворителе) водным раствором хлорида магния, чтобы в исследуемом образце были соли только двузарядного металла. При хроматографировании солей однозарядных металлов в кислотных или нейтральных растворителях важно, чтобы адсорбент не содержал двузарядных ионов. Гонзалес-Састре и Фолч-Пи [166] использовали слои силикагеля H с добавкой оксалата калия в качестве изолирующего агента по отношению к кальцию, который мог бы попасть в элюат при хроматографировании трифосфоинозитидов. Когда растворителем служит смесь хлороформ—метанол—7 н. раствор гидроксида

аммония (10:10:1), то одно- и двузарядные ионы вытесняются солями двузарядного аммония [164]. Абрамсон и Блехер [167] описали методику двумерного разделения фосфолипидов на слоях основного силикагеля, образованных при нанесении на пластинку силикагеля G в виде кашицы с 0,01 M раствором карбоната натрия. Элюирование проводили на активированных при 110°C пластинках сначала смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода (250:74:19:3), затем основным растворителем, представляющим собой смесь хлороформ—метанол—7 M раствор гидроксида аммония (230:90:15). С помощью этой системы можно разделить следующие соединения: лизолецитин, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилинозит, фосфатидилсерин, фосфатилэтанолламин, фосфатидиновую кислоту и кардиолипин.

Приготавливая хроматографические пластинки для разделения бактериальных липидов, Минникин и Абдолрахимзаде [168] смешивали 40 г силикагеля Merck PF<sub>254</sub> и 100 мл 0,2 %-ного раствора ацетата натрия в виде кашицы и наносили на подложку. На таком слое при элюировании смесью хлороформ—метанол—вода (65:25:4) фосфатидилглицерин дает компактное пятно; на непританых слоях пятно этого соединения вытянуто. Авторы работы [168] провели двумерное хроматографирование, элюируя пробу во втором направлении смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода (80:12:18:5). Для разделения фосфолипидов и гликолипидов, содержащихся в растениях, Лепаж [169] также применял двумерную (под углом 90°) хроматографию. Первым элюентом служила смесь хлороформ—метанол—вода (65:25:4), вторым—диизобутилкетон—уксусная кислота—вода (8:5:1). Под действием первой смеси происходило удовлетворительное разделение фосфолипидов, вторая смесь была более эффективна при разделении гликолипидов и сопутствующих им гликозидов стерина. Среди реагентов для обнаружения хроматограмм была испытана смесь хлорной кислоты и реагента Шиффа [170]. Пластинки сначала опрыскивали 0,5 %-ным раствором периодата натрия и оставляли на 5 мин, после чего выдерживали в атмосфере диоксида серы, чтобы удалить избыток периодата натрия, затем опрыскивали 0,5 %-ным раствором *n*-розанилина (свежеобесцвеченного диоксидом серы) и оставляли до появления синих и пурпурных пятен. Чтобы осветлить фон, пластинки опрыскивали 1 %-ным раствором хлорной кислоты. Если в заключение обработать пластинки реагентом Т-167 (см. т. 1, гл. 7), под действием которого обнаруживаются фосфатидилэтанолламин и кардиолипин, то на хроматограмме обнаружатся все полярные липиды, причем окраска пятен устойчиво сохраняется несколько недель [168].

Скидмор и Энтенмен [171] также использовали двумерное хроматографирование для разделения фосфатидов печени крыс на слоях силикагеля. Первое элюирование эти авторы проводили смесью хлороформ—метанол—7 н. раствор гидроксида аммония (60 : 35 : 5), второе — той же смесью, но при соотношении компонентов соответственно (35 : 60 : 5). В первом растворителе получены следующие значения  $R_f$ : фосфатидиновая кислота 0,73, фосфатидилсерин 0,19; фосфатидилэтанолламин 0,58; фосфатидинозит 0,31; фосфатидилхолин 0,35; сфингомиелин 0,19 и лизофосфатидилхолин 0,11. Получены также  $R_f$  типичных продуктов гидролиза этих соединений.

Ятцкевитц [172] применил двустадийный метод для разделения сфинголипидов мозга, а Пейн [173] использовал те же растворители для анализа липидов нервных тканей. На слоях кремневой кислоты первое элюирование велось смесью хлороформ—метанол—вода (14 : 6 : 1) при длине пути элюирования 15 см. Затем пластинки сушили и элюировали на 10 см смесью *n*-пропанол—12,5 %-ный раствор гидроксида аммония (39 : 11). Величины  $R_f$  этой группы соединений приведены в табл. 23.8.

Адамс и Сэлли [174] описали методику двустадийного хроматографирования на силикагеле в камере, выложенной бумагой. Сначала пробу элюировали в течение 9 мин смесью тетрагидрофуран—метанол (3 : 1). После этого удаляли растворитель и повторяли элюирование в том же направлении на 17 см смесью хлороформ—метанол—4 М раствор гидроксида аммония (75 : 37 : 7). Несковиц и Костиц [175] комбинировали в двустадийном методе кислотные и основные растворители. Они готовили адсорбционные слои по методу Раузера и др. [176]: 54 г силикагеля Н и 6 г тонкоразмолотого флоризила смешивали со 135 мл воды до образования кашицы. Первое элюирование проводили на 15 см смесью хлороформ—метанол—30 %-ный аммиак—вода (140 : 50 : 7 : 3); второе элюирование вели до самого верха пластинки смесью хлороформ—уксусная кислота—метанол—вода (160 : 4 : 20 : 1,5). Применяя сульфат магния, удается почти полностью избежать растекания пятен кислотных липидов [176].

Кауфман и др. [177] пользовались в качестве растворителя насыщенной нитратом серебра смесью хлороформ—эфир—уксусная кислота (97 : 2,3 : 0,5); этой смесью на слоях силикагеля, пропитанных нитратом серебра, разделяли лецитины. После окончания разделения фракции элюировали со слоев силикагеля и гидролизovali. Входящие в состав смесей жирные кислоты разделяли на слоях сульфата кальция [66]. Приветт и др. [178, 179] определили структуру лецитинов с помощью предложенного ими метода восстановительного озонлиза, используя

Таблица 23.8

Приблизительные величины  $R_f \times 100$  липидов нервных тканей. Многостадийное элюирование на силикагеле [173] <sup>а, б</sup>

Липид	$R_f \times 100$
Ганглиозид а	2,2
Ганглиозид б	2,7
Ганглиозид с	9
Ганглиозид д	13
Лизоцефалин	22
Фосфатидилсерин	25
Лизолецитин	27
Сфингомиелин а	31
Сфингомиелин б	33
Лецитин	46
Эфиры цереброзидсерной кислоты а	61
Эфиры цереброзидсерной кислоты б	64
Фосфатидилэтанолламин	67—80 <sup>в</sup>
Френозин	93
Керазин	96
Холестерин	99
Свободные жирные кислоты	100

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co

<sup>б</sup> Первое элюирование на расстоянии 15 см смесью хлороформ—метанол—вода (14 : 6 : 1), второе элюирование на 10 см смесью *n*-пропанол—12,5 %-ный раствор аммиака (39 : 11).

<sup>в</sup> Первое число — величина  $R_f$ , найденная для заднего фронта пятна, второе число — величина  $R_f$ , соответствующая переднему фронту пятна

тонкослойную хроматографию для разделения конечных продуктов.

Ренконен [180], анализируя глицерофосфатиды, сначала проводил дефосфорилирование обработкой смесью уксусной кислоты и уксусного ангидрида. Полученные таким образом диглицеридацетаты он фракционировал по числу двойных связей в молекуле на слоях кремневой кислоты, пропитанных раствором нитрата серебра.

Из-за тенденции фосфолипидов к образованию прожилков при хроматографировании на силикагеле Манголд и Каммерек

[109] вводили в слой силикагеля 10 % сульфата аммония. Это позволяло избежать образования прожилок при применении растворителей, наиболее удобных для разделения соединений этой группы. Каулен [181] обнаружил, что небольшая (0,4 %) добавка сульфата аммония к слою силикагеля способствует четкому отделению фосфатидилсерина от фосфатидилинозита, а при больших (до 10 %) добавках величина  $R_f$  первого из них возрастает, пока не станет равной  $R_f$  фосфатидилэтаноламина. Хоррокс [182], исследуя фосфолипиды головного мозга, испытал ряд пропитывающих веществ (табл. 239). Он проводил элюирование в необлицованных камерах, но предварительно в камере устанавливалось равновесие. Все слои, кроме пропитанных боратом натрия, готовили, смешивая 27 г силикагеля G с 3 г пропитывающего реагента и 60 г воды, при пропитке боратом натрия силикагель добавляли к 20 мл насыщенного раствора бората, разбавленного водой до объема 60 мл. Ятцкевитц и Мель [183] применяли в качестве растворителей абсолютный диэтиловый эфир, а также смеси *n*-пропанол—12,5 %-ный раствор гидроксида аммония (4:1) и *n*-пропанол—17 %-ный раствор гидроксида аммония (7:3). Вейкер и др. [184] пользовались как растворителем смесью пропанол—1 н. раствор гидроксида аммония—вода (6:2:1).

Липиды головного мозга исследовали Ятцкевитц [185, 186], Вагнер и др. [154], Кочетков и др. [187, 188], а также Мюльднер и др. [189]. Хонеггер [190, 191] сравнивал липиды головного мозга пациентов, страдающих множественным склерозом, и нормальных людей, а Плиц и Ятцкевитц [192] определяли содержание сфингомиелинов  $C_{18}$  и  $C_{24}$  в нормальном и в патологическом мозге. Ятцкевитц [172] и Кун и др. [193] анализировали ганглиозиды, взятые из головного мозга крупного рогатого скота, для четырех соединений этой группы они получили на силикагеле G со смесью *n*-пропанол—вода (7:3) следующие величины  $R_f$  0,55; 0,35; 0,23 и 0,18. Уиттинг и др. [194], исследуя ганглиозиды нескольких видов, изменили соотношение компонентов в указанной смеси до 3:1, чтобы можно было хроматографировать ганглиозиды на пластинке длиной 50 см. При этом образованием прожилок и хвостов можно было пренебречь.

Дейн и др. [195] показали, что смесь бутанол—пиридин—вода (3:2:1,5), а также 78 %-ный водный раствор фенола — эффективные растворители для фракционирования ганглиозидов. Уэррет и Камингс [196] сравнивали хроматограммы экстрактов тканей головного мозга, селезенки и почек с хроматограммами ганглиозидов, приготовленных из очищенной коры головного мозга быка, и предположительно идентифицировали как ганглиозиды восемь полос на хроматограммах тканей. Работы

Таблица 239

Величины  $R_f \times 100$  липидов головного мозга в различных растворителях  
Длина пути элюирования 10 см [182]<sup>a</sup>

Липид	Силикагель G			Силикагель G, пропитанный				
	хлороформ— метанол— вода (65 25 4)	хлороформ— метанол— гидроксид аммония (62 25 4)	хлороформ— метанол— гидроксид аммония (75 25 4)	боратом натрия	ацетатом натрия	гидрокси- дом калия	щавелевой кислотой	сульфатом аммония
Цереброзид	89	96	58	44	90	61	82	77
Фосфатидилэтаноламин	85	93	49	35	85	55	79	70
Фосфатидилсерин	78	90	47	59	92	45	55	65
Лизофосфатидилэтаноламин	6	29	11	35	57	41 <sup>б</sup>	78 <sup>б</sup>	65
Лизофосфатидилсерин	55	46	21		70		29	37
Фосфатидилхолин	6	63	00	45	14	35	35	47
Лизофосфатидилхолин	55	28	13	30	77		10	7
Сфингомиелин	31	47	24	35	46	20	19	30
Цереброзидсульфат	47		41	30	58	28	50	65
			36	30	67	23	35	55

<sup>a</sup> С разрешения авторов и American Oil Chemists' Society  
<sup>б</sup> Наблюдается образование прожилок

Кленка и Гилена [197—199], Куна и Вигандта [200], Джонсона и Макк-Клора [201], Уэррета и др. [202], Корея и Джонатаса [203] и Самбасиварао и Мак-Клора [204] внесли определенный вклад в структурный анализ ганглиозидов человеческого мозга.

Ханда и Бертон [205] анализировали ганглиозиды, извлеченные из сетчатки глаз быка методом непрерывного испарения. Разделение завершалось в течение 3 ч. Свеннерхольм [206] и Ледин [207] опубликовали обзоры работ, посвященных ганглиозидам.

Кочетков и др. [208] показали, что двумерная хроматография представляет собой эффективный способ разделения производных сфингозина. Эти авторы применяли следующие четыре смеси растворителей: бутанол—этилацетат—11 %-ный раствор гидроксида аммония (15:8:2), бутанол—этилацетат—5 %-ный раствор муравьиной кислоты (15:4:1) и хлороформ—метанол (3:2 и 2:3). С кислотным растворителем получены следующие величины  $R_f$ : сфингозин 0,40, дигидросфингозин 0,39, О-метилловый эфир сфингозина 0,34, О-метилловый эфир дигидросфингозина 0,24, психозин и дигидропсихозин 0,15. Последние два соединения можно разделить, но не полностью, при элюировании смесью хлороформ—метанол (2:3); полученные при этом величины  $R_f$  равны 0,20 и 0,14. Фуджино и Забин [209] и Вейс и Стиллер [210] анализировали сфингозиновые основания Самбасиварао и Мак-Клор [211] разделяли свободные основания на силикагеле, элюируя их смесью хлороформ—метанол—2 н. раствор гидроксида аммония (40:10:1). Михалек [212, 213] использовал двумерное хроматографирование для разделения динитрофенильных производных сфингозиновых оснований. Первое элюирование велось на слоях силикагеля G, пропитанного раствором тетрабората натрия, смесью хлороформ—метанол (9:1); перед вторым элюированием слой пропитывали 5 % тетралина и элюировали пробу верхней фазой смеси метанол—тетралин—вода (9:1:1). В работе [213] описано разделение на слое оксида алюминия. В первом направлении в этом случае элюирование проводили смесью хлороформ—метанол (49:1), а дальнейшее хроматографирование осуществлялось так же, как на слоях силикагеля. Для того чтобы отделить основания сфинголипидов от сложных сфинголипидов, авторы работы [214] окисляли пробу тетраоксидом осмия. Величины  $R_f$  окисленных продуктов отличались от  $R_f$  исходных соединений.

Эберляйн и Геркен [215] исследовали гликофинголипиды красных кровяных телец различных видов млекопитающих. Церамидгексозиды отделяли от других липидов и разделяли на

фракции моно-, ди- и тригликозилцерамидов смесью тетрагидрофуран—вода (5:1) на слоях смеси силикагеля HR и силиката магния (4:1). Комплексные гликофинголипиды отделяли друг от друга и от других липидов на кизельгуре G, пропитанном смесью 0,6 М раствора борной кислоты и 0,15 М буферного раствора динатрийтетрабората (рН 7,9) и высушенном затем в течение 24 ч на воздухе. Растворителем для этого разделения служила смесь хлороформ—метанол—вода (65:25:4).

Несковиц и др. [216] отделяли гликолипиды от фосфолипидов на смеси силикагеля H с тонкоразмолотым флоризилом (27:3) методом двустадийного хроматографирования, применяя в качестве первого растворителя смесь хлороформ—ацетон—пиридин—20 %-ный раствор аммиака—вода (10:15:30:1:1). Для второй стадии они использовали четыре различных растворителя в зависимости от состава гликолипидов. Цереброзиды, сульфатиды и моногалактозилдиглицерид разделяли смесью хлороформ—ацетон—метанол—уксусная кислота—вода (65:35:11:4:1,5). Нейтральные церамидгликозиды разделяли смесью хлороформ—метанол—вода (65:25:4). Цереброзиды, сульфатиды, церамиды, сфингозин и психозин разделяли смесью хлороформ—ацетон—метанол—вода (65:30:2:2). Церамиды, моногалактозилдиглицерид, глюкоцереброзиды, галактоцереброзиды, сульфатиды и психозин анализировали на слоях, частично пропитанных боратом натрия, элюируя пробу такой же смесью, но с другим соотношением компонентов (68:26:12.5:3).

Хевет и др. [217] предпочитают при разделении смесей алкенилацил- и диацилхолинфосфатидов, различающихся по степени ненасыщенности остатков жирных кислот, слой силикагеля, пропитанный раствором нитрата серебра, и смесь хлороформ—метанол—вода (70:25:2).

Висванатан и др. [218] разработали методику двумерной реакционной ТСХ для анализа смесей алкенилацил-, алкилацил- и диацилхолинфосфатидов, а также для анализа фосфатидплазмалогенов [219]. Оуэнс [220] предложил метод определения плазмалогенов двумерным хроматографированием, предусматривающий проведение реакции в адсорбционном слое.

Хьюз и Фрейз [221] изучали фосфолипиды, полученные из нормальных и пораженных болезнью мышечных тканей, а Филиппарт и Менкес [222] исследовали большую часть гликолипидов, взятых из селезенки, пораженной болезнью Гоше. Грэй [223], а также Керри и др. [224] исследовали фосфолипидный состав опухолевых тканей.

В работе [225] описан метод количественного выделения чистого сфингомиелина из мозгов людей и крыс, а в работе [226]—

препаративный метод выделения цереброзида, сульфатида и сфингомиелина из мозга.

Методом ТСХ исследованы липиды печени здоровых мышей [227], надпочечных желез крыс [228], почек кроликов [229], мозга и печени крупного рогатого скота [230], мозга свиней [231], синаптического сосуда головного мозга крыс [232], надпочечных желез собак [233], белых мышц тунца [234], печени зародыша цыпленка [235] и эритроцитов крупного рогатого скота [236]. Из митохондрии печени крыс выделен фосфатидилглицерин [237].

Раузер и др. [238] улучшили разделение фосфолипидов на слоях силикагеля с добавкой 10 % силиката магния при элюировании 0,01 М раствором гидроксида калия. С этой целью авторы [238] проводили двумерное разделение со следующими тремя различными смесями растворителей:

а) в первом направлении хлороформ—метанол—25 %-ный раствор аммиака (13:5:1), во втором — хлороформ—ацетон—метанол—уксусная кислота—вода (3:4:1:1:0,5);

б) в первом направлении то же, что и в а), но при соотношении компонентов 13:7:1, во втором — то же, что и в а), но при соотношении компонентов 5:2:1:1:0,5;

в) в первом направлении хлороформ—метанол—вода (65:25:4) и во втором—*n*-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1).

Висванатан и др. [239], анализируя стоявший в течение 6 недель раствор фосфатидплазмогенов в смеси хлороформа с метанолом, выделили альдегидогенный фосфолипид. В экстрактах, поступивших в работу сразу после приготовления, это соединение обнаружено не было.

Снайдер [240] исследовал поведение гликолипидных аналогов, содержащих гидроксильные, кетонные, простые или сложные эфирные группы, в 11 растворителях и опубликовал обзор [241] химических и физических свойств липидов, содержащих простые эфирные связи, а также результатов их хроматографирования.

Для обнаружения фосфолипидов Диттмер и Лестер [242] использовали несколько модифицированный вариант молибдатного реактива [243] — реактив Т-167 (см. т. 1, гл. 7). Для обнаружения сфинголипидов можно применять предложенный Бишелем и Остином [244] вариант бензидинового реактива [245], обозначенного Т-37.

Ренконен и Варо [246] опубликовали обзор работ по ТСХ фосфатидов и гликолипидов; Ренконену [247] принадлежит также обзор по ТСХ субклассов и молекулярных видов полярных липидов.

## 8. ВОСКИ

Кауфман и Дас [248] хроматографировали пчелиный воск на силикагеле G при 22°C, используя в качестве растворителя смесь трихлорэтан—хлороформ (3:1). В той же системе, но при 42°C они хроматографировали шеллак, карнаубский воск и воск подсолнечника. Для разделения кислот, содержащихся в воске, они применяли хроматографию с обращенными фазами на слоях сульфата кальция (гипса), пропитанных нефтяной фракцией с температурой кипения 240—260°C. Разделение проводили при 42°C, используя в качестве растворителя смесь изопропанол—этанол—уксусная кислота—вода (8:3:4:1,3) (относительно разделения спиртов из воска см. т. 1, гл. XIV).

Хаахти и др. [249, 250] анализировали методом ТСХ воски и стеринные эфиры, содержащиеся в сале, отобранном с поверхности кожи животных. При разделении адсорбентами служили силикагель, оксид алюминия, а также силикагель, пропитанный раствором нитрата серебра. Никкари и Хаахти [251] нашли в липидах, отобранных с поверхности шкурки крыс, два типа диэфиров. Они проводили ТСХ на силикагеле со смесями бензол—гексан (1:1) и гексан—эфир (9:1) в качестве растворителей. Николаидес и др. [252] также нашли диэфирные воски в липидах с поверхности кожи животных. Они применяли многостадийное элюирование: вначале элюировали до половины высоты пластинки смесью гексан—эфир—уксусная кислота (80:20:1), затем доверху смесью гексан—эфир (19:1) и еще раз доверху, но уже только гексаном.

Холлоуэй и Чоллен [253] исследовали на нескольких адсорбентах 60 различных природных восков и 15 классов веществ, входящих в состав воска; наиболее эффективным адсорбентом оказался силикагель G. В числе прочих растворителей испытаны были тетрахлорид углерода, дихлорметан, смеси бензол—хлороформ (7:3) и хлороформ—этилацетат (1:1). Для получения удовлетворительного разделения необходимо применять не менее двух растворителей. Рейтнер [254] хроматографировал 32 товарных воска на силикагеле при повышенных температурах. Он применял следующие растворители: бензол, смеси бензол—уксусная кислота (99,5:0,5) и бензол—метилацетат (98:2) — все при 45°C; тетрахлорэтилен при 80°C и смесь тетрахлорэтилен—уксусная кислота (99,5:0,5) при 70°C. По окончании хроматографирования удалял растворители, нагревая пластинки до 160°C, опрыскивал их 5 %-ным раствором фосфомолибденовой кислоты в метаноле и затем прокаливал 15 мин при 160°C.

Диче [255] хроматографировал углеводородные воски на смеси силикагеля и мочевины (3:2), элюируя пробы смесью тетрахлорид углерода—этанол (7:3). Вследствие различной



способности компонентов воска образовывать соединения включения на этом адсорбенте были получены значения  $R_f$ , отличающиеся от  $R_f$ , полученных на одном силикагеле. Пятна восков обнаруживали, опрыскивая пластинки 0,05 %-ным раствором флуоресцеина, и облучали УФ-светом.

Кауфман и др. [256] хроматографировали сложные эфиры воска, диэфирные воски и другие необычные липиды на слоях оксида магния и смеси оксида магния с силикагелем, используя в качестве растворителя смесь гексан—эфир—этилацетат (60 : 40 : 1).

### 9. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОВ

Для количественного определения липидов применялись почти все методы количественного анализа результатов ТСХ. Виок и Холмен [257] оценивали содержание сложных эфиров колориметрически. После разделения соединений пятна экстрагировали диэтиловым эфиром и переводили соединения в гидроксамовые кислоты. С этой целью к каждой экстрагированной пробе добавляли по 0,1 мл 2,5 %-ного раствора гидроксида натрия и 0,1 мл 2,5 %-ного раствора гидрохлорида гидроксиламина (оба раствора в 95 %-ном этаноле), нагревали на водяной бане при 65—70°C до полного испарения растворителя, охлаждали, добавляли 5 мл обнаруживающего реактива — перхлората железа. В результате образовывались окрашенные комплексы. Через 30 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 520 нм. Обнаруживающий реагент можно приготовить следующим образом [257]: сначала исходный раствор, содержащий 5,0 г перхлората железа (не желтого) в 10 мл 70 %-ной хлорной кислоты плюс 10 мл дистиллированной воды, разбавляют до объема 100 мл холодным абсолютным этанолом. Далее 4 мл этого раствора плюс 3 мл 70 %-ной хлорной кислоты разбавляют до 100 мл охлажденным абсолютным этанолом и сразу же после этого используют реактив.

Уолш и др. [258] также получал гидроксамовые кислоты для определения содержания липидных сложных эфиров в ячмене и солоде. В этом случае сложные эфиры не элюировали с силикагеля, а проводили реакцию непосредственно на слое. Перед колориметрическими измерениями центрифугированием удаляли силикагель. Средний выход составлял 98,8 % при стандартной погрешности  $\pm 0,35$  %. Анализ липидов, не содержащих сложноэфирных групп, эти авторы проводили видоизмененным колориметрическим методом Джонсона [259] с использованием двухромовой кислоты.

Цолнер и Кирш [260] применяли для количественного опреде-

ления липидов в плазме видоизмененную сульфофосфованилиновую реакцию.

Роуган и Бэт [261] определяли содержание сульфолипидов колориметрически. Предварительно они обрабатывали фенолом и серной кислотой образцы, соскобленные с поверхности слоя адсорбента. Этот метод оказался более чувствительным, чем антроновый [262]. Для определения содержания галактолипидов использовали ту же реакцию, но с уменьшенной концентрацией фенола. Бандиопадхнай [263] определял содержание полностью насыщенных триглицеридов, гидролизую элюированный продукт и устанавливая затем количество глицерина по реакции с хромотроповой кислотой.

Другой колориметрический метод, который можно применить к фосфолипидам, заключается в следующем: образец растворяют в хлорной кислоте и определяют содержание фосфора с помощью раствора молибдата аммония. Курри и др. [161] обрабатывали пятна на силикагеле 0,4 мл 70 %-ной хлорной кислоты в специальной пробирке, осторожно выпаривая на маленьком огне до полного высушивания. Остаток растворяли в 12 %-ной хлорной кислоте и нагревали 10 мин на бане с кипящей водой. Такая обработка затрагивает не только фосфолипиды: в результате ее силикагель переходит в нерастворимое состояние. После охлаждения определяли содержание фосфора по методу Вогнера [153, 264, 265]: к пробе добавляли 0,3 мл 2,5 %-ного раствора молибдата аммония и 0,3 мл свежеприготовленного 10 %-ного раствора аскорбиновой кислоты. Смесь тщательно встряхивали и выдерживали 2 ч при 38°C, после чего раствор центрифугировали и определяли его коэффициент поглощения при длине волны 820 нм. Робинсон и Филлипс [266, 267] вместо аскорбиновой кислоты использовали в качестве восстановителя 1-амино-2-нафтол-4-сульфоновую кислоту, а Растоджи и др. [268]—раствор 2,4-динитрофенилгидразина в соляной кислоте. Дойзаки и Зиве [269] применили для подобных определений несколько другой метод: они обрабатывали липиды серной кислотой с добавкой пероксида водорода.

Габерман и др. [151] снимали пятна с хроматографической пластинки, сушили их, озолляли, а затем обрабатывали золу молибдатом.

Иногда нужно элюировать фосфолипиды с адсорбционного слоя для последующего анализа, но в некоторых случаях это трудно сделать. Френч и Андерсен [270] чередовали двукратное элюирование смесью хлороформ—метанол (2 : 1) с двукратным элюированием смесью хлороформ—метанол—вода (3 : 5 : 2). Раузер и др. [271, 272] считают ненужным элюировать фосфолипиды с силикагеля для определения содержания фосфора, а Тихи [273] нашел, что для образования синего комплекса фосфомили-

бдата необходима очень сильная кислотная среда с pH от 0,5 до 0,7. Раузер и др. [274] опубликовали обзор существующих методов анализа полярных липидов. Кляйниг и Лемперт [275] описали методику микроанализа фосфолипидов, пригодную для определения содержания фосфолипида порядка 0,5 нмоль.

Авторы работ [276—278] измеряли площади пятен и коррелировали результаты измерений с массой пробы или какой-либо ее функцией.

Приветт и Бланк [279, 280] применяли для количественных определений разработанную Кирхнером и др. [281] общую методику обнаружения соединений всех типов: хроматограмму опрыскивают концентрированной серной кислотой, содержащей окислитель, и прокалывают до обугливания пятен. Поскольку на результаты анализа может влиять переменная толщина адсорбционного слоя, перед нанесением образца надо проверить приготовленную пластинку с помощью денситометра. После разделения пробы надо тщательно испарить с пластинки растворителя, а затем слегка опрыскать ее насыщенным раствором бихромата калия в 80 %-ной (по массе) серной кислоте. Затем хроматографическую пластинку прокалывают 25 мин при 180°C, чтобы обуглить выделенное соединение. В прежних работах использовали 50 %-ный водный раствор серной кислоты с последующим прокалыванием при 360°C, но оказалось, что количество углерода в каждом пятне зависит от равновесия между испарением и окислением [280]. Соединения, кипящие при более низких температурах, способны сильнее испаряться, чем кипящие при более высоких температурах, до того как произойдет обугливание; в то же время соединения, кипящие при более высоких температурах, меньше поддаются окислению до свободного углерода. Оптическую плотность обугленных пятен измеряют денситометром со щелью размером 1×5 мм; отсчет ведут через каждый миллиметр перемещения по длине пластинки. Площади под денситометрическими кривыми прямо пропорциональны количеству образца. Поскольку из равных количеств структурно различных соединений образуются разные количества углерода, необходимо получить калибровочную кривую для анализа соединения данного типа. Например, кривая, построенная для триолеинов, непригодна для анализа насыщенных трипальмитиновых соединений. Следует подчеркнуть однако, что совершенно необязательно брать в качестве калибровочного стандарта именно то соединение, содержание которого предстоит определить; достаточно, чтобы оно было того же типа.

Для обугливания применяли и другие реагенты (см. т. I, гл. VII, разд. 1). Наттер и Приветт [282] получили более однородное обугливание, когда перед разделением методом ТСХ гидроенизовали ненасыщенные липиды на катализаторе оксиде

платины (катализатор Адамса, изготовлен фирмой Matheson, Coleman and Bell). Более распространенные полярные липиды, вообще говоря, труднее поддающиеся разделению, все-таки можно разделить в области желательных значений  $R_f$  от 0,3 до 0,8 при продуманном выборе растворителей и адсорбентов. Хобанов и др. [283], применяли аналогичный прием при разделении триглицеридов. Они выдерживали пластинки после разделения в течение 30 мин в парах брома, чтобы насытить двойные связи. Даунинг [284] опубликовал метод анализа нейтральных липидов с использованием обугливания, не требующий применения калибровочных смесей для определения относительного содержания компонентов в образце. Кастеллани и др. [285] исследовали соотношение между площадью, ограниченной денситометрическим пиком, и концентрацией липида.

Араки [33] проводил денситометрию пятен липидов, опрысканных 5 %-ным этанольным раствором фосфомолибдата и прогретых в течение 5 мин при 180°C; после такой обработки пятна можно наблюдать визуально. Несковиц [286] полностью минерализовал фосфолипиды, проводя опрыскивание смесью 1 мл 5 %-ного раствора молибдата аммония, 3 мл концентрированной азотной кислоты и 16 мл 65 %-ной хлорной кислоты, затем прокалывал накрытую стеклом пластинку в течение часа в печи, где за полчаса температура поднималась со 120 до 160°C. В последние 10 мин покровное стекло снимали. После прокалывания слой на пластинках опрыскивали смесью 2 мл 5 %-ного раствора молибдата аммония, 3 мл 65 %-ной хлорной кислоты и 5 мл 1 %-ного раствора аскорбиновой кислоты, и выдерживали час при 50°C под покровным стеклом. Далее пластинки промывали смесью парафинового углеводорода и эфира (1:1), слой при этом становился прозрачным, и их можно было фотометрировать. Ганглиозиды определяли [287] денситометрически; окрашивание появлялось после опрыскивания слоя смесью резорцина и соляной кислоты.

Для количественного определения липидов, разделенных методом ТСХ, были также использованы все известные методы измерения радиоактивности (см. т. I, гл. XI, разд. 6). Казанг и др. [288] разработали полуавтоматический скребок для снятия зон с адсорбционных слоев, а Снайдер и Кимбл [289], а также Фосслен и др. [290] — автоматические скребки для определения содержания радиоактивных липидов. Эти приспособления рассмотрены в т. I, гл. V, разд. 5. Фосслен [291] описал автоматический прибор для экстракции образцов и нанесения пятен при исследовании липидов.

Николози и др. [292] предложили для определения компонентов пяти классов липидов метод флуоресценции *in situ*. Они сочли необходимым проводить до хроматографического разделения

гидрогенизацию компонентов смеси, чтобы избежать помех, вызываемых флуоресценцией родамина 6G при взаимодействии с ненасыщенными соединениями. Однако Рох и Гросберг [293] нашли, что избежать помех можно также, если не опрыскивать слой родамином 6G, а заранее вводить его в адсорбент. Эти авторы смогли определить наномолярные количества компонентов при суммарном содержании липидов порядка 120 мкг. Хейнемен и др. [294] применяли 0,01 %-ный раствор 1-анилин-8-нафталин-сульфоната магния в качестве реактива, вызывающего флуоресценцию фосфолипидов.

Петер и Вольф [295] разработали чувствительный флуоресцентный метод определения содержания фосфолипидов *in situ* вплоть до  $10^{-8}$  г. Чтобы получить нужное разделение, пластинку со слоем силикагеля выдерживали в течение часа в атмосфере паров смеси серной кислоты и воды (1:1), а затем в атмосфере паров смеси бензола с метанолом, содержавшей от 2 до 16 % метанола в зависимости от характера анализируемых соединений. Элюирующий растворитель представлял собой смесь легкого петролейного эфира, хлороформа, метанола и воды (6:8:8:1). Образцы наносили с помощью линомата фирмы САМА G, потому что при этом достигалось лучшее разделение, чем при нанесении образца в виде пятен. Чтобы слой флуоресцировал, готовую хроматограмму опрыскивали смесью концентрированной серной кислоты с эфиром (1:19) и нагревали 10 мин в сушильном шкафу при 100°C. Устойчивая флуоресценция сохранялась в течение нескольких месяцев. Измерение интенсивности свечения проводили при длине волны 400 нм, а возбуждали флуоресценцию облучением светом с длиной волны 360 нм.

Комарек и др. [36], Виок и др. [296], Уилльямс и др. [297], Данн и Робсон [298] осуществили прямой гравиметрический анализ липидных веществ.

Для количественного анализа фракций, разделенных методом ТСХ, можно использовать ГХ [42, 299, 301]. Применение последней особенно эффективно при определении состава смесей жирных кислот. Обычно такие кислоты предварительно переводят в метиловые эфиры одним из известных методов. При использовании ГХ ни в коем случае не следует применять пары иода в качестве индикатора, так как результаты определения ненасыщенных соединений при этом окажутся заниженными, а результаты анализа насыщенных соединений завышенными. Очевидно, что это связано с реакцией иода с ненасыщенными соединениями [302]. Разработан также метод хроматографирования на поверхности трубки, покрытой изнутри силикагелем или смесью силикагеля и оксида меди, с последующим испарением или пиролизом разделенных соединений и определением их с помощью газофазных детекторов (см. т. 1, гл. XI, разд. 7).

Приветт и др. [303] обобщили литературу, посвященную методам количественного анализа липидов, а также денситометрии обугленных хроматограмм [304]. Куксис [305] опубликовал обзор работ по количественному анализу липидов посредством сочетания ТСХ и ГХ. Макс и Кварлесу [306] принадлежит обзор методов анализа ганглиозидов. Раузер и др. [307] опубликовали обзор по применению колоночной и тонкослойной хроматографии для количественного анализа смесей полярных липидов.

Вацикова и др. [37] определяли содержание жирных кислот, титруя элюированные фракции.

#### 10. ПРОЧИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ ТСХ

Фишер и др. [308] с помощью двумерной хроматографии исследовали липиды муки, полученной из семи различных сортов пшеницы. Таким способом удается обнаружить 23 компонента. Отмечены различия между изученными образцами, обусловленные сортом, сезоном и окружающей средой. Нельсон и др. [309] изучали липиды, полученные из цельной пшеницы, а Мак-Килликен и Симс [310] исследовали липиды эндоспермы трех канадских сортов пшеницы.

Аллен и др. [311] разделили липиды шпината методом колоночной хроматографии, следя за фракционированием с помощью ТСХ, осуществляемой на пластинках с кремневой кислотой.

Кауфман и Висванатан [312] анализировали липиды кожи и волос, а Бей [313, 314] изучал кожные выделения, извлеченные из загрязненной одежды.

Врен и Щепановска [315] исследовали применение 4-метил-2,6-ди-*трет*-бутилфенола (ВНТ) в качестве антиоксиданта при хроматографии липидов. Это соединение вводят в концентрации 0,005 % в состав хроматографического растворителя. Хотя очень часто выводить антиоксидант из липидных фракций не требуется, это можно сделать, проводя хроматографирование в тетрахлориде углерода. Авторы работы [315] указали также другие методы удаления ВНТ, например вакуумную сушку и перегонку с водяным паром. Мицев и др. [316] исследовали различные антиоксиданты для хроматографии липидов, опрыскивая адсорбционный слой 1,5 мл 0,01 %-ного раствора антиоксиданта и высушивая слой перед употреблением. Наиболее эффективные антиоксиданты — это этиловый, пропиловый, октиловый и лауриловый эфиры галловой кислоты. ТСХ — очень эффективный метод обнаружения подделки липидов. В табл. 23.10 перечислены примеры ее применения для обнаружения подделки жиров. Мани и Лакшминараяна [361] опубликовали обзор различных хроматографических методов обнаружения подделки жиров и масел.

Синее флуоресцентное свечение некоторых образцов оливкового масла, по-видимому, обусловлено появившимися в этом

Таблица 23.10

Применение тонкослойной хроматографии для обнаружения подделки  
липидных веществ

Вещество, используемое для подделки	Липид — объект подделки	Литература
Растительные и другие инородные жиры	Сливочное масло	317—320, 321—324, 325—327
Заменители масла-какао	Масло-какао	328
Экстрагированный жир какао	Отжатый жир какао	329
Минеральные масла	Растительные масла	330—333
Синтетические эфиры—смазочные масла	Съедобные масла	334
Растительные масла	Оливковое масло	335
Касторовое масло	Растительные масла	336, 337
Оливковое масло, экстрагированное растворителем	Отжатое оливковое масло	338
Кукурузное масло	Оливковое масло	338, 339
Оливковое масло	Масло семян	338
Арахисовое, аргемоновое, льняное масла	Горчичное масло	340—341
Кокосовое, пальмовое масла	Растительные масла	342
Аргемоновое масло	„ „	343
Животный жир	„ „	344—347
Растительное масло	Кокосовое масло	348
Арахисовое масло	Касторовое масло	349
Масло семян <i>C. Guizotia defera</i>	Кунжутное масло	350
Арахисовое, картаминовое, льняное масла	„ „	351
Горчичное, соевое, картаминовое масла	Арахисовое масло	352
Соевое масло	Подсолнечное масло	353
Подсолнечное масло	Оливковое масло	354
Абрикосовое масло	Миндальное масло	355
Тяжелое масло	Ворвань	356
Молочный жир	Другие жиры	357
Липиды	Покрытие сушеных фруктов	358
Печень	Мясные консервы	359
Конина и мясо кенгуру	Другие виды мяса	360

масле грибами плесени. Флуоресцирующее вещество было выделено из грибов плесени, растущих на маслинах [362].

Приветт и др. [179] анализировали восемь липидов, методами ТСХ и ГХ и установили, что содержащиеся в лецитине жирные кислоты насыщены по  $\alpha$ - и не насыщены по  $\beta$ -связи. Акер и Гриве [363] использовали ТСХ для определения степени окисления продуктов яичной пасты.

Перди и Трутер [364—367] опубликовали ряд статей по разделению и выделению поверхностных липидов листьев, а Теркелль и Тристрем [368] исследовали липиды листьев люцерны.

Курри [369] исследовал липиды (и стероиды), содержащиеся в иле эуганейского бассейна.

Предложенный Миллером и Кирхнером [370] эффективный метод хроматографирования сначала на колонке, а затем на тонкослойной пластинке был использован для исследования липидов [61, 371—375].

ТСХ применяли также при изучении различных реакций с участием липидов. Ван Деенен и др. [376] проследили действие токсина *Clostridium welchii* на фосфатиды оболочек эритроцитов. Гауглиц и Малинс [377] использовали ТСХ для анализа промежуточных и конечных продуктов синтеза полиненасыщенных альдегидов, а Гауглиц и Леман [378] следили с ее помощью за образованием алкильных сложных эфиров из полиненасыщенных триглицеридов. Ван Деенен и де Хаас [379] изучали особенности субстрата фосфолипазы А, полученной из *Crotalus adamanteus*, Эпплуайт и др. [380] контролировали методом ТСХ чистоту амидов кислот клещевины.

Кауфман и др. [381—383] изучали липиды кофейных бобов, а Кауфман и Висванатан [384] анализировали липиды, полученные из перегноя.

Можно также упомянуть и о применении ТСХ липидов в области медицины. Тыюна и др. [385] наново оценили пробу по поглощению триолеина, меченного  $^{131}\text{I}$ . Уилльямс и др. [297] определяли методом ТСХ типы липидов, содержащихся в отбросах и фекалиях. Каунитц и др. [386, 387] исследовали реакцию Шварцмана, вызываемую продуктами, содержащими окисленный жир печени трески. Хорнинг [388] исследовал пробы липидов, взятых у больных атеросклерозом, сочетая ТСХ и ГХ. Джейки и др. [389] нашли новую липидную фракцию в сыворотке крови больных атеросклерозом и диабетом. Пайфер и др. [390] исследовали успокаивающее действие липидов, полученных из целой рыбы и из жиров, содержащихся в ней.

Литтерс [391] разделял на слоях кремневой кислоты липиды дрожжей и затем хроматографировал нейтральные липидные фракции на силикагеле G со свежеперегнанным хлороформом в качестве растворителя. В результате были получены следующие

величины  $R_f$ : пальмитат холестерина 0,96; холестерин 0,32; монопальмитат глицерина 0,15; дипальмитат глицерина 0,46 и трипальмитат глицерина 0,63.

Хьюз [392] анализировал методом ТСХ экстракт из культивированного гриба *Agaricus campestris*; выделенные жирные кислоты были проанализированы газохроматографически.

Мак-Килликен и Симс [393] наблюдали изменение состава липидных веществ в льне «Раджа» и индийском картаине на различных стадиях созревания. Оказалось, что по мере созревания семян этих растений относительное содержание различных классов липидов меняется, причем больше всего это касается фосфолипидов. Ни свободных жирных кислот, ни моноили диглицеридов при этом обнаружено не было. Ганстоун и др. [394] хроматографировали масло семян *Jatropha curcas* на слоях силикагеля, пропитанных раствором нитрата серебра. Они применяли ТСХ также для наблюдения за кристаллизацией липидов из смеси ацетона с метанольным раствором нитрата серебра.

Дюбеш и др. [395] предостерегают хроматографистов: до разделения пластинки нельзя держать в камерах, атмосфера которых насыщена уксусной кислотой. Пары кислоты могут гидролизовать енольные эфирные связи плазмалогенов, которые после этого можно принять за лизофосфатиды. Раузер и др. [369] показывают, как избежать появления примесей при химических исследованиях липидов в лабораторных условиях. Источниками этих примесей могут быть лабораторные мыла, моющие средства, кремы для рук и лосьоны, красители для волос, лабораторные смазки, воски для покрытия пола, пары масел, табачный дым и углеводородные фазы, применяемые в газовой хроматографии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fontell K., Holman R. T., Lambertsen G., J. Lipid Res., 1, 391 (1960).
2. Copius-Peereboom J. W., Chem. Weekbl., 57, 625 (1961).
3. Mangold H. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 708 (1961).
4. Becker E., Ber. Getreidetäg., Detmold, 1963, 77.
5. Kaneko H., Kawanishi Y., Yukagaku, 12, 597 (1963); Chem. Abstr., 60, 7119 (1964).
6. Hagony P. L., Olaj Szappan Kozmet., 13, 46 (1964), Chem. Abstr., 62, 807 (1965).
7. Padley F. B., "Thin-Layer Chromatography of Lipids", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 87.
8. Viswanathan C. V., Chromatogr. Rev., 11, 153 (1969).
9. Shenstone F., "Thin-Layer Chromatography of Lipids", in "Biochemistry and Methodology of Lipids", A. R. Johnson, Ed., Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 171.
10. Padley F. B., Chromatogr., Rev., 8, 208 (1966).

11. Kaufmann H. P., Viswanathan C. V., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 538 (1963).
12. Mangold H. K., Fette, Seifen, Anstrichm., 61, 877 (1959).
13. Nichols B. W., Biochim. Biophys. Acta, 70, 417 (1963).
14. Vogel W. C., Doizaki W. M., Zieve Z., J. Lipid Res., 3, 138 (1962).
15. Kaufmann H. P., Makus Z., Fette, Seifen, Anstrichm., 62, 1014 (1960).
16. Freeman G. P., West D., J. Lipid Res., 7, 324 (1966).
17. Storry J. H., Tuckley B., Lipids, 2, 501 (1967).
18. Kelley T. F., J. Chromatogr., 22, 456 (1966).
19. Manners M. J., Kidder D. E., Parsons P. M., J. Chromatogr., 43, 276 (1969).
20. Palmer D. C., Kintzios J. A., Papadopoulos N. M., J. Chromatogr., Sci., 10, 107 (1972).
21. Hubmann F.-H., J. Chromatogr., 86, 197 (1973).
22. Svetashev V. I., Vaskovsky V. E., J. Chromatogr., 67, 376 (1972).
23. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Прянишникова С. А., Эрастов Д. П., Молек. биол., 1, 184 (1967).
24. Pollack J. D., Clark D. C., Somerson N. L., J. Lipid Res., 12, 563 (1971).
25. Tarr G. E., J. Chromatogr., 52, 357 (1970).
26. Niederwieser A., J. Chromatogr., 21, 326 (1966).
27. Niederwieser A., Honegger C. C., "Gradient Techniques in Thin-Layer Chromatography", in "Advances in Chromatography", Vol. 2, J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1966, p. 123.
28. Duthie A. H., Atherton H. V., J. Chromatogr., 51, 319 (1970).
29. Huhnstock K., Weicker H., Klin. Wochenschr., 38, 1249 (1960).
30. Weicker H., Klin. Wochenschr., 37, 763 (1959).
31. Laur M. H., Compt. Rend., 257, 1501 (1963).
32. Zoellner N., Wolfram G., Klin. Wochenschr., 40, 1100 (1962).
33. Araki E., Nisshin Igaku, 50, 85 (1963); Chem. Abstr., 59, 11866 (1963).
34. Mangold H. K., Malins D. C., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 383 (1960).
35. Malins D. C., Mangold H. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 576 (1960).
36. Komarek R. J., Jensen R. G., Pickett B. W., J. Lipid Res., 5, 268 (1964).
37. Vaciková A., Felt B., Maliková J., J. Chromatogr., 9, 301 (1962).
38. Lie K. B., Nyc J. F., J. Chromatogr., 8, 75 (1962).
39. Whitner V. S., Grier O. T., Mann A. N., Witter R. F., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 1154 (1965).
40. Kaufmann H. P., Das B., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 214 (1962).
41. Kaufmann H. P., Makus Z., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 63, 689 (1961).
42. Kaufmann H. P., Wessels H., Fette, Seifen, Anstrichm., 66, 13 (1964).
43. Litchfield C., Lipids, 3, 170 (1968).
44. Kaufmann H. P., Wessels H., Fette, Seifen, Anstrichm., 66, 81 (1964).
45. Gunstone D., Padley F. B., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 957 (1965).
46. de Vries B., Jurriens G., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 725 (1963).
47. Barrett C. B., Dallas M. S. J., Padley F. B., Chem. Ind. (London), 1962, 1050.
48. Renkonen O., Rikkinen L., Acta Chem. Scand., 21, 2282 (1967).
49. Wessels H., Rajagopal N. S., Fette, Seifen, Anstrichm., 71, 543 (1969).
50. Morris L. J., Wharry D. M., Hammond E. W., J. Chromatogr., 31, 69 (1967).
51. Wood R., Snyder F., J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 53 (1966).
52. Burns D. T., Stretton R. J., Shepherd G. F., Dallas M. S. J., J. Chromatogr., 44, 399 (1969).
53. Barrett C. B., Dallas M. S. J., Padley F. B., J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 580 (1963).
54. de Vries B., Jurriens G., J. Chromatogr., 14, 525 (1964).
55. den Boer F. C., Z. Anal. Chem., 205, 308 (1964).
56. Jurriens G., Riv. Ital. Sostanze Grasse, 42, 116 (1965).

57. *Morris L. J.*, *J. Lipid Res.*, **7**, 717 (1966).
58. *Morris L. J.*, *Nichols B. W.*, "Argentation Thin-Layer Chromatography", in "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. 1, A. Niederwieser, G. Pataki, Eds., Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1970, p. 75.
59. *Luddy F. E.*, *Barford R. A.*, *Herb S. F.*, *Riemenschneider R. W.*, Am. Oil Chemists' Society Meeting, Minneapolis, September, 30, 1963.
60. *Wolf D. P.*, *Dugan L. R.*, Jr. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 139 (1964).
61. *Jensen R. G.*, *Sampugna J.*, *Parry R. M.*, Jr., *J. Dairy Sci.*, **45**, 842 (1962).
62. *Jensen R. G.*, *Sampugna J.*, *Parry R. M.*, Jr., K. M. Shahani, R. C. Chandan, *J. Dairy Sci.*, **45**, 1527 (1962).
63. *Slakey S. P. M.*, *Lands W. E. M.*, *Lipids*, **3**, 30 (1968).
64. *Brockhoff H.*, *J. Lipid Res.*, **8**, 167 (1967).
65. *Kaufmann H. P.*, *Khoe T. H.*, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **64**, 81 (1962).
66. *Michalec C.*, *Sulc M.*, *Měšťán J.*, *Nature*, **193**, 63 (1962).
67. *Kaufmann H. P.*, *Makus Z.*, *Khoe T. H.*, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **64**, 1 (1962).
68. *Krell K.*, *Hashim S. A.*, *J. Lipid Res.*, **4**, 407 (1963).
69. *Malins D. C.*, *Chem. Ind. (London)*, **1960**, 1359.
70. *Brown J. L.*, *Johnston J. M.*, *J. Lipid Res.*, **3**, 480 (1962).
71. *Privett O. S.*, *Blank M. L.*, *Lundberg W. O.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 312 (1961).
72. *Privett O. S.*, *Blank M. L.*, *J. Lipid Res.*, **2**, 37 (1961).
73. *Rybicka S. M.*, *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 308.
74. *Rybicka S. M.*, *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 1947.
75. *Jensen R. C.*, *Sampugna J.*, *Gander G. W.*, *J. Dairy Sci.*, **44**, 1983 (1961).
76. *Hofmann A. F.*, *J. Lipid Res.*, **3**, 391 (1962).
77. *Schewe T.*, *Coutelle C.*, *Acta Biol. Med. Germ.*, **24**, 223 (1970).
78. *Heusser D.*, *J. Chromatogr.*, **33**, 62 (1968).
79. *Ord W. O.*, *Bamford P. C.*, *Chem. Ind.*, **1966**, 1681.
80. *Douglas A. G.*, *Powell T. G.*, *J. Chromatogr.*, **43**, 241 (1969).
81. *Kaufmann H. P.*, *Mukherjee K. D.*, *Khalid Q.*, *Nahrung*, **11**, 631 (1967).
82. *Mizany A. I.*, *J. Chromatogr.*, **31**, 96 (1967).
83. *Winkler L.*, *Heim T.*, *Schenk H.*, *Schlag B.*, *Goetze E.*, *J. Chromatogr.*, **70**, 164 (1972).
84. *Addison R. F.*, *Ackman R. G.*, *Anal. Biochem.*, **28**, 515 (1969).
85. *Bergstroem S.*, *Carlson L. A.*, *Weeks J. R.*, *Pharmacol. Rev.*, **20**, 1 (1968).
86. *Amin M.*, *J. Chromatogr.*, **108**, 313 (1975).
87. *Davis H. A.*, *Horton E. W.*, *Jones K. B.*, *Quilliam J. P.*, *Brit. J. Pharmacol.*, **42**, 569 (1971).
88. *Wickramasinghe J. A. F.*, *Shaw S. R.*, *Prostaglandins*, **4**, 903 (1973).
89. *Kiefer H. C.*, *Johnson C. R.*, *Arora K. L.*, *Kantor H. S.*, *Anal. Biochem.*, **68**, 336 (1975).
90. *Daniels E. G.*, "Chromatography of Prostaglandins", in "Lipid Chromatographic Analysis", 2nd ed., Vol. 2, Marcel Dekker, Ed., New York, 1968, p. 611.
91. *Shaw J. E.*, *Ramwell P. W.*, "Separation, Identification and Estimation of Prostaglandins", in "Methods of Biochemical Analysis", Vol. 17, D. Glick, Ed., Interscience, New York, 1969, p. 325.
92. *Horton E. W.*, *Prostaglandins*, Springer, Berlin, 1972, p. 21.
93. *Kaufmann H. P.*, *Su Ko Y.*, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **63**, 828 (1961).
94. *Subbaram M. R.*, *Roomi M. W.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 324 (1966).
95. *Subbarao R.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 235 (1964).
96. *Subbarao R.*, *Roomi M. W.*, *Subbaram M. R.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 295 (1962).
97. *Roomi M. W.*, *Subbaram M. R.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 106 (1964).

98. *Roomi M. W.*, *Subbaram M. R.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **24**, 93 (1966).
99. *Vioque E.*, *J. Chromatogr.*, **39**, 235 (1969).
100. *Morris L. J.*, *Holman R. T.*, *Fontell K.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 323 (1960).
101. *Morris L. J.*, *Hayes H.*, *Holman R. T.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 316 (1961).
102. *Morris L. J.*, *Holman R. T.*, *Fontell K.*, *J. Lipid Res.*, **2**, 68 (1961).
103. *Sgoutas D.*, *Kummerow F. A.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 138 (1963).
104. *Bazán N. G.*, *Cellik S. Jr.*, *Acta Biochem.*, **45**, 309 (1972).
105. *Malins D. C.*, *Wekell J. C.*, *Houle C. R.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 44 (1964).
106. *Malins D. C.*, *Wekell J. C.*, *Houle C. R.*, *Anal. Chem.* **36**, 658 (1964).
107. *Malins D. C.*, *Houle C. R.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 43 (1963).
108. *Bordwell F. G.*, *Garbisch E. W.*, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3588 (1960).
109. *Mangold H. K.*, *Kammereck R.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 201 (1962).
110. *Mangold H. K.*, *Gellerman J. L.*, *Schlenk H.*, *Federation Proc.*, **17**, 268 (1958).
111. *Applewhite T. H.*, *Diamond M. J.*, *Goldblatt L. A.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**, 609 (1961).
112. *Hammonds T. W.*, *Shone G.*, *J. Chromatogr.*, **15**, 200 (1964).
113. *Ruseva-Atanasova N.*, *J. Janák*, *J. Chromatogr.*, **21**, 207 (1966).
114. *Oette K.*, *Doss M.*, *J. Chromatogr.*, **32**, 439 (1968).
115. *Saha S.*, *Dutta J.*, *Lipids*, **8**, 653 (1973).
116. *Morris L. J.*, *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 1238.
117. *Morris L. J.*, *J. Chromatogr.*, **12**, 321 (1963).
118. *Бергельсон Л. Д.*, *Дятловицкая Е. В.*, *Воронкова В. В.*, *Изв. АН СССР, Отд. хим. наук.* **1963**, 954.
119. *Bergel'son L. D.*, *Dyatlovitskaya E. V.*, *Voronkova V. V.*, *J. Chromatogr.*, **15**, 191 (1964).
120. *Вережагин А. Г.*, *Скворцова С. В.*, *Докл. АН СССР*, **157**, 699 (1964).
121. *Ord W. O.*, *Bamford P. C.*, *Chem. Ind. (London)*, **1967**, 277.
122. *Paulose M. M.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 141 (1966).
123. *Mangold H. K.*, *Kammereck R.*, *Malins D. C.*, *Microchem. J., Symp. Ser.*, **2**, 697 (1961, опубликовано в 1962).
124. *Schlenk H.*, *Gellerman J. L.*, *Anal. Chem.*, **32**, 1412 (1960).
125. *Stoll A.*, *Rutschmann J.*, *von Wartburg A.*, *Renz J.*, *Helv. Chim. Acta*, **39**, 993 (1956).
126. *Mangold H. K.*, *Kammereck R.*, *Chem. Ind. (London)*, **1961**, 1032.
127. *Jantzen E.*, *Andreas H.*, *Angew. Chem.*, **70**, 656 (1958).
128. *Jantzen E.*, *Andreas H.*, *Chem. Ber.*, **92**, 1427 (1959).
129. *White H. B. Jr.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 213 (1966).
130. *Minnikin D. E.*, *Smith S. J.*, *J. Chromatogr.*, **103**, 205 (1975).
131. *Privett O. S.*, *Nickell E. C.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 414 (1962).
132. *Privett O. S.*, *Nickell E. C.*, *J. Lipid Res.*, **4**, 208 (1963).
133. *Privett O. S.*, *Nickell E. C.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 72 (1964).
134. *Privett O. S.*, *Blank M. L.*, *Romanus O.*, *J. Lipid Res.*, **4**, 260 (1963).
135. *Roehm J. N.*, *Privett O. S.*, *J. Lipid Res.*, **10**, 245 (1969).
136. *Kaufmann H. P.*, *Mukherjee K. D.*, *Khalid Q.*, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **69**, 820 (1967).
137. *Kannan R.*, *Subbaram M. R.*, *Achaya K. T.*, *J. Chromatogr.*, **24**, 433 (1966).
138. *Hradec J.*, *Menšík P.*, *J. Chromatogr.*, **32**, 502 (1968).
139. *Badings H. T.*, *J. Chromatogr.*, **14**, 265 (1964).
140. *Wren J. J.*, *Szczepanowska A. D.*, *J. Chromatogr.*, **14**, 405 (1964).
141. *Neudoerffer T. S.*, *Lea C. H.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 138 (1966).
142. *Cornelius J. A.*, *Shone G.*, *Chem. Ind. (London)*, **1963**, 1246.
143. *Metcalfe L. D.*, *Schmitz A. A.*, *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961).
144. *Dhopeswarkar G. A.*, *Mead J. F.*, *J. Lipid Res.*, **3**, 238 (1962).

- 110 Часть II
145. *Dhopeswarkar G. A., Mead J. F.*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **109**, 425 (1962).
  146. *Kaufmann H. P., Viswanathan C. V.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 925 (1963).
  147. *Firestone D.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 247 (1963).
  148. *Rieche A., Schultz M., Seyfarth H. E., Gottschalk G.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **63**, 198 (1962).
  149. *Privett O. S., Blank M. L.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **309**, 465 (1962).
  150. *Privett O. S., Nickell E. C.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 189 (1963).
  151. *Habermann E., Bandtlow G., Krusche B.*, Klin. Wochenschr., **39**, 816 (1961).
  152. *Wagner H.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **62**, 1115 (1960).
  153. *Ibid.*, **63**, 1119 (1961).
  154. *Wagner H., Hoerhammer L., Wolff P.*, Biochem. Z., **334**, 175 (1961).
  155. *Viswanathan C. V.*, J. Chromatogr., **75**, 141 (1973).
  156. *Pohl P., Glasl H., Wagner H.*, J. Chromatogr., **49**, 488 (1970).
  157. *Kunz F., Kosin D.*, Clin. Chim. Acta, **27**, 185 (1970).
  158. *Curri S. B., Ninjo V.*, Riv. Anat. Patol. Oncol., **23**, 479 (1963); Chem. Abstr., **60**, 4445 (1964).
  159. *Curri S. H., Mazzoni S.*, Acta Neurol. (Naples), **19**, 32 (1964); Chem. Abstr., **61**, 3408 (1964).
  160. *Curri S. B., Raso M., Rossi C. R.*, Histochemie, **4**, 113 (1964); Chem. Abstr., **61**, 13623 (1964).
  161. *Curri S. B., Rossi C. R., Sartorelli L.*, "Direct Analysis of Phospholipids of Mitochondria and Tissue Sections by Thin-Layer Chromatography", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 174.
  162. *Skipski V. P., Peterson R. F., Barclay M.*, J. Lipid Res., **3**, 467 (1962).
  163. *Skipski V. P., Peterson R. F., Sanders J., Barclay M.*, J. Lipid Res., **4**, 227 (1963).
  164. *Nielsen H.*, J. Chromatogr., **89**, 275 (1974).
  165. *Nielsen H.*, J. Chromatogr., **114**, 419 (1975).
  166. *Gonzalez-Sastre F., Folch-Pi J.*, J. Lipid Res., **9**, 532 (1968).
  167. *Abramson D., Blecher M.*, J. Lipid Res., **5**, 628 (1964).
  168. *Minnikin D. E., Abdolrahimsadeh H.*, J. Chromatogr., **63**, 452 (1971).
  169. *Lepage M.*, J. Chromatogr., **13**, 99 (1964).
  170. *Baddiley J., Buchanan J., Handschumacher R. E., Prescott J. F.*, J. Chem. Soc., **1956**, 2818.
  171. *Skidmore W. D., Entenman C.*, J. Lipid Res., **3**, 471 (1962).
  172. *Jatzkewitz H.*, J. Physiol. Chem., **326**, 61 (1961).
  173. *Payne S. N.*, J. Chromatogr., **15**, 173 (1964).
  174. *Adams G. M., Sallee T. L.*, J. Chromatogr., **49**, 552 (1970).
  175. *Neskoic M. N., Kostic D. M.*, J. Chromatogr., **35**, 297 (1968).
  176. *Rouser G., Galli C., Lieber E., Blank M. L., Privett O. S.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 836 (1964).
  177. *Kaufmann H. P., Wessels H., Bondopadhyaya C.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 543 (1963).
  178. *Privett O. S., Blank M. L.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 70 (1963).
  179. *Privett O. S., Blank M. L., Schmit J. A.*, J. Food Sci., **27**, 463 (1962).
  180. *Renkonen O.*, Acta Chem. Scand., **18**, 271 (1964).
  181. *Kaulen H. D.*, Anal. Biochem., **45**, 664 (1972).
  182. *Horrocks L. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 235 (1963).
  183. *Jatzkewitz H., Mehl E.*, Z. Physiol. Chem., **320**, 251 (1960).
  184. *Weicker H., Dain J. A., Schmidt G., Thannhauser S. J.*, Federation Proc., **19**, 219 (1960).
  185. *Jatzkewitz H.*, Z. Physiol. Chem., **320**, 134 (1960).
  186. *Jatzkewitz H.*, "Brain Lipids Lipoproteins Leucodystrophies", Proc. Neurochem. Symp. Rome, **1961**, 147 (1963).
  187. *Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Glukhoded I. S.*, Biochim. Biophys. Acta, **60**, 431 (1962).
  188. *Кочетков Н. К., Жукова И. Г., Глухоед И. С.*, Докл. АН СССР, **139**, 708 (1961).
  189. *Mueldner H. G., Wherrett J. R., Cumings J. N.*, J. Neurochem., **9**, 607 (1962).
  190. *Honegger C. G.*, Helv. Chim. Acta, **45**, 281 (1962).
  191. *Honegger C. G.*, Helv. Chim. Acta, **45**, 2020 (1962).
  192. *Pliz H., Jatzkewitz H.*, J. Neurochem., **11**, 605 (1964).
  193. *Kuhn R., Wiegand H., Egge H.*, Angew. Chem., **73**, 580 (1961).
  194. *Whitting L. A., Krishnan R. S., Sakr A. H., Horwith M. K.*, Anal. Biochem., **22**, 295 (1968).
  195. *Dain J. A., Weicker H., Schmidt G., Thannhauser S. J.*, "Cerebral Sphingolipidoses", Symp. Tay-Sachs Disease Allied Disorders, New York, N. Y., **1961**, 289 (1962); Chem. Abstr., **58**, 739 (1963).
  196. *Wherrett J. R., Cumings J. N.*, Biochem. J., **86**, 378 (1963).
  197. *Klenk E., Gielen W.*, Z. Physiol. Chem., **323**, 126 (1961).
  198. *Klenk E., Gielen W.*, Z. Physiol. Chem., **326**, 144 (1961).
  199. *Klenk E., Gielen W.*, Z. Physiol. Chem., **333**, 162 (1963).
  200. *Kuhn R., Wiegand H.*, Chem. Ber., **96**, 866 (1963).
  201. *Johnson G. A., McCluer R. H.*, Biochim. Biophys. Acta, **70**, 487 (1963).
  202. *Wherrett J. R., Lowden J. A., Wolfe L. S.*, Can. J. Biochem., **42**, 1057 (1964).
  203. *Korey S. R., Gonatas J.*, Life Sci., **2**, 296 (1963).
  204. *Sambasivarao K., McCluer R. H.*, J. Lipid Res., **5**, 103 (1964).
  205. *Handa S., Burton R. M.*, Lipids, **4**, 205 (1969).
  206. *Svennerholm L.*, J. Lipid Res., **5**, 145 (1964).
  207. *Ledeer R.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **43**, 57 (1966).
  208. *Кочетков Н. К., Жукова И. Г.* и др., Изв. АН СССР, Сер. хим., **147**, 987 (1962).
  209. *Fujino Y., Zabin J.*, J. Biol. Chem., **237**, 2069 (1962).
  210. *Weiss B., Stiller R. L.*, J. Lipid Res., **6**, 159 (1965).
  211. *Sambasivarao K., McCluer R. H.*, J. Lipid Res., **4**, 106 (1963).
  212. *Michalec C.*, J. Chromatogr., **24**, 228 (1966).
  213. *Michalec C.*, J. Chromatogr., **20**, 594 (1965).
  214. *Klijaic K., Goimerac A., Prostenik M.*, Acta Pharm. Jugosl., **25**, 1 (1975); Anal. Abstr., **29**, 3D60 (1975).
  215. *Eberlein K., Gercken G.*, J. Chromatogr., **61**, 285 (1971).
  216. *Neskoic N. M., Nussbaum J. L., Mandel P.*, J. Chromatogr., **49**, 255 (1970).
  217. *Noevet S. P., Viswanathan C. V., Lundberg W. O.*, J. Chromatogr., **34**, 195 (1968).
  218. *Vismanathan C. V., Phillips P., Lundberg W. O.*, J. Chromatogr., **38**, 267 (1968).
  219. *Viswanathan C. V., Phillips P., Lundberg W. O.*, J. Chromatogr., **35**, 66 (1968).
  220. *Owens K.*, Biochem. J., **100**, 354 (1966).
  221. *Hughes B. P., Frais F. F.*, Biochem. J., **96**, 6P (1965).
  222. *Philippart M., Menkes J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 551 (1964).
  223. *Gray G. M.*, Biochem. J., **86**, 350 (1963).
  224. *Curri S. B., Costantini F. E., Carteri A., Manzin E.*, Riv. Anat. Patol. Oncol., **24**, 1132 (1963).
  225. *Hausheer L., Pedersen W., Bernhard K.*, Helv. Chim. Acta, **46**, 601 (1963).
  226. *Wells M. A., Dittmer J. C.*, J. Chromatogr., **18**, 503 (1965).
  227. *Nelson G. J.*, J. Lipid Res., **3**, 256 (1962).
  228. *Angelico R., Cavina G., D'Antona A., Giocoli G.*, J. Chromatogr., **18**, 57 (1965).
  229. *Morgan T. E., Tinker D. O., Hanahan D. J.*, Arch. Biochem. Biophys., **103**, 54 (1963).

230. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E., J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 425 (1963).
231. Kishimoto Y., Radin N. S., J. Lipid Res., **5**, 94 (1964).
232. Burton R. M., Gibbons J. M., Biochim. Biophys. Acta, **84**, 220 (1964).
233. Ta-Chuang L. C., Sweeley C. C. Biochemistry, **2**, 592 (1963).
234. Shuster C. Y., Froines J. E., Olcott H. S., J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 36 (1964).
235. Manzoli F. A., Carinci P., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **40**, 1283 (1964).
236. Hanahan D. J., Ekholm J., Jackson C. M., Biochemistry, **2**, 630 (1963).
237. Gray G. M., Biochim. Biophys. Acta, **84**, 35 (1964).
238. Rouser G., Simon G., Kritchevsky G., Lipids, **4**, 599 (1969).
239. Viswanathan C. V., Hoevet S. P., Lundberg W. O., White J. M., Mucchi G. A., J. Chromatogr., **40**, 225 (1969).
240. Snyder F., J. Chromatogr., **82**, 7 (1973).
241. Snyder F., "The Chemistry, Physical Properties and Chromatography of Lipids Containing Ether Bonds", in "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. II, A. Niederwieser, Pataki G., Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 105.
242. Dittmer J. C., Lester R. L., J. Lipid Res., **5**, 126 (1964).
243. Zinzadze C., Ind. Eng. Chem., **7**, 227 (1935).
244. Bischel M. D., Austin J. H., Biochim. Biophys. Acta, **70**, 598 (1963).
245. Bressler A., Biochim. Biophys. Acta, **39**, 375 (1960).
246. Renkonen O., Varo P., Lipid Chromatogr. Anal., **1**, 41 (1967).
247. Renkonen O., "Thin-Layer Chromatographic Analysis of Subclasses and Molecular Species of Polar Lipids", in "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. II, A. Niederwieser, G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 143.
248. Kaufmann H. P., Das B., Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 398 (1963).
249. Hahti E., Nikkari T., Acta Chem. Scand., **17**, 536 (1963).
250. Hahti E., Nikkari T., Juva K., Acta Chem. Scand., **17**, 538 (1963).
251. Nikkari T., Hahti E., Biochim. Biophys. Acta, **164**, 294 (1968).
252. Nicolaidis N., Fu H. C., Ansari M. N. A., Lipids, **5**, 299 (1970).
253. Holloway P. J., Challen S. B., J. Chromatogr., **25**, 336 (1966).
254. Reutner F., Fette, Seifen, Anstrichm., **70**, 162 (1968).
255. Dietsche W., Fette, Seifen, Anstrichm., **72**, 778 (1970).
256. Kaufmann H. P., Mangold H. K., Muherjee K. D., J. Lipid Res., **12**, 506 (1971).
257. Vioque E., Holman R. T., J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 62 (1962).
258. Walsch D. E., Banasik O. J., Gilles K. A., J. Chromatogr., **17**, 278 (1965).
259. Johnson J., J. Biol. Chem., **181**, 707 (1941).
260. Zoellner N., Kirsch K., Z. Ges. Exp. Med., **135**, 545 (1962).
261. Roughan P. G., Batt R. D., Anal. Biochem., **22**, 74 (1968).
262. Russell G. B., Anal. Biochem., **14**, 205 (1966).
263. Bandyopadhyay C., J. Chromatogr., **37**, 123 (1968).
264. Wagner H., "Chromatogr.", Symp. 2nd, Brussels, 1962, 243.
265. Wagner H., Congr. Sci. Farm., Conf. Commun., **21**, Pisa, 1961, 911 (1962).
266. Robinson N., Phillips B. M., Clin. Chim. Acta, **8**, 385 (1963).
267. Robinson N., Phillips B. M., Clin. Chim. Acta, **8**, 832 (1963).
268. Rastogi S. C., Srivastava K. C., Tiwari R. D., Z. Anal. Chem., **253**, 208 (1971).
269. Doizaki W. M., Zieve L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **113**, 91 (1963).
270. French J. A., Andersen D. W., J. Chromatogr., **80**, 133 (1973).
271. Rouser G., Siakotos A. N., Fleischer S., Lipids, **1**, 85 (1966).
272. Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A., Lipids, **5**, 494 (1970).
273. Tichý J., J. Chromatogr., **78**, 89 (1973).
274. Rouser G., Kritchevsky G., Galli C., Heller D., J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 215 (1965).
275. Kleinig H., Lempert U., J. Chromatogr., **53**, 595 (1970).
276. Purdy S. J., Truter E. V., Analyst (London), **87**, 802 (1962).
277. Penick R. J. M., Meisler M. H., McCluer R. H., Biochim. Biophys. Acta, **116**, 279 (1966).
278. Duden R., Czihaklo M., Z. Anal. Chem., **245**, 289 (1969).
279. Privett O. S., Blank M. L., J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 520 (1962).
280. Blank M. L., Schmidt J. A., Privett O. S., J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 371 (1964).
281. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G., Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
282. Nutter L. J., Privett O. S., J. Chromatogr., **35**, 519 (1968).
283. Chobanov D., Tarandjiska R., Chobanova R., J. Am. Oil Chem. Soc., **53**, 48 (1976).
284. Downing D. T., J. Chromatogr., **38**, 91 (1968).
285. Castellani T., Kjelgaard-Nielsen P., Wolff-Jensen J., J. Chromatogr., **104**, 123 (1975).
286. Neskovic N. M., J. Chromatogr., **27**, 488 (1967).
287. Smid F., Reinisová J., J. Chromatogr., **86**, 200 (1973).
288. Kasang G., Goeldner G., Weiss N., J. Chromatogr., **59**, 393 (1971).
289. Snyder F., Kimble H., Anal. Biochem., **11**, 510 (1965).
290. Fosslien E., Musil F., Domizi D., L. Blickenstaff, J. Lumeng, J. Chromatogr., **63**, 131 (1971).
291. Fosslien E., J. Chromatogr., **63**, 59 (1971).
292. Nicolosi R. J., Smith S. C., Santerre R. F., J. Chromatogr., **60**, 111 (1971).
293. Roch L. A., Grossberg S. E., Anal. Biochem., **41**, 105 (1971).
294. Heyneman R. A., Bernard D. M., Vercauteren R. E., J. Chromatogr., **68**, 285 (1972).
295. Peter H. W., Wolf H. U., J. Chromatogr., **82**, 15 (1975).
296. Vioque E., Morris L. J., Holman R. T., J. Am. Oil Chem. Soc., **38**, 489 (1961).
297. Williams J. A., Sharma A., Morris L. J., Holman R. T., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **105**, 192 (1960).
298. Dunn E., Robson P., J. Chromatogr., **17**, 501 (1965).
299. Bowyer D. E., Leat W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A., Biochem. Biophys. Acta, **70**, 423 (1963).
300. Amenta J. S., J. Lipid Res., **5**, 270 (1964).
301. Huston C. K., Albro P. W., J. Bacteriol., **88**, 425 (1964).
302. Nichaman Z., Sweeley C. C., Oldham N. M., Olson R. E., J. Lipid Res., **4**, 484 (1963).
303. Privett O. S., Blank M. L., Godding D. W., Nickell E. C., J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 381 (1965).
304. Privett O. S., Dougherty K. A., Erdahl W. L., "Quantitative Analysis of the Lipid Classes by Thin-Layer Chromatography via Charring and Densitometry", in "Quantitative Thin-Layer Chromatography", J. C. Touchstone, Ed., Wiley, New York, 1973, p. 57.
305. Kuksis A., Chromatogr. Rev., **8**, 172 (1966).
306. Max S. R., Quarles R. H., "Quantitative Thin-Layer Chromatography of Gangliosides", in "Quantitative Thin-Layer Chromatography", J. C. Touchstone, Ed., Wiley, New York, 1973, p. 235.
307. Rouser G., Kritchevsky G., Galli C., Heller D., J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 215 (1965).
308. Fischer N., Broughton M. E., Peel D. J., Bennett R., J. Sci. Food Agric., **15**, 325 (1964).
309. Nelson J. H., Glass R. L., Geddes W. F., Cereal. Chem., **40**, 337 (1963).
310. McKillican M. E., Sims R. P., J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 341 (1964).
311. Allen C. F., Good P., Davis H. F., Fowler S. D., Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 424 (1964).
312. Kaufmann H. P., Viswanathan C. V., Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 607 (1963).



313. *Bey K.-H.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 611 (1963).  
 314. *Bey K.-H.*, Am. Perfum. Cosmet., **79**, 35 (1964).  
 315. *Wren J. J., Szczepanowska A. D.*, J. Chromatogr., **14**, 405 (1964).  
 316. *Mitsev I., Slavčeva J., Popova A.*, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., **20**, 693 (1967).  
 317. *McGugan W. A.*, Int. Dairy Congr., 15th, London, 1959, 1534 (1960).  
 318. *Lakshminarayana G.*, J. Proc. Oil Technol. Assoc. India, Kampur, **21**, Part 2, 77 (1966).  
 319. *Ramamurthy M. K., Narayanan K. M., Bhalerao V. R., Dastur N. N.*, Indian J. Dairy Sci., **20**, 11 (1967).  
 320. *Bachmann M.*, Schweiz. Milchztg., **95**, 1018 (1965); Anal. Abstr., **19**, 2663 (1970).  
 321. *Chakrabarty M. M., Bandyopadhyay C., Bhattacharyya D., Gayen A. K.*, J. Chromatogr., **36**, 84 (1968).  
 322. *Chakrabarty M. M., Bhattacharyya D., Gayen A. M.*, J. Chromatogr., **44**, 116 (1969).  
 323. *Guillaumin R.*, Rev. Er. Corp. Gras, **12**, 29 (1965).  
 324. *Hendriks H., Huyghebaert A. A.*, Meded. Rijksfac. Landbouwet., Gent, **33**, 331 (1968); Chem. Abstr., **71**, 2188g (1969).  
 325. *Hendriks H., Huyghebaert A. A.*, Meded. Rijksfac. Landbouwet., Gent, **71**, 515 (1969).  
 326. *Huyghebaert A., Hendriks H.*, Meded. Rijksfac. Landbouwet., Gent, **33**, 523 (1968), Chem. Abstr., **71**, 2191c (1969).  
 327. *Chakrabarty M. M., Gayen A. K.*, J. Oil Technol. Assoc. India, **6**, 69 (1974).  
 328. *Kaufmann H. P., Wessels H., Das B.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **64**, 723 (1962).  
 329. *Meyer H.*, Rev. Int. Choc., **17**, 270 (1962).  
 330. *Hyryläinen M.*, Farm. Aikak., **72**, 161 (1963); Chem. Abstr., **59**, 5753 (1963).  
 331. *Seitz F. G.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **68**, 314 (1966).  
 332. *Chand S., Srinivasulu C., Mahapatra S. N.*, **106**, 475 (1975).  
 333. *Mani V. V. S., Lakshminarayana G.*, Indian J. Technol., **2**, 416 (1964).  
 334. *Crump G. B.*, Analyst (London), **88**, 456 (1963).  
 335. *Sliwiok J.*, Microchim. Acta, **1965**, 294.  
 336. *Lakshminarayana G., Mani V. V. S.*, Indian J. Technol., **2**, 320 (1964).  
 337. *Lakshminarayana G.*, Annual Reports, 1965—66, Reg. Res. Lab., Hyderabad, India, p. 4.  
 338. *Kotakis G.*, Rev. Fr. Corps Gras, **14**, 143 (1967).  
 339. *Dimoulas C.*, Rev. Fr. Corps Gras, **16**, 721 (1969).  
 340. *Ghkrabarty M. M., Bhattacharyya D., Mondal B.*, Indian J. Technol., **1**, 473 (1963).  
 341. *Ghkrabarty M. M., Talapatra K., Roy J. K.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **69**, 642 (1967).  
 342. *Sengupta P., Bose A., Mathews T. V.*, J. Inst. Chem. Calcutta, **45**, 168 (1973).  
 343. *Verma M. R., Rai J., Ram A.*, Int. Symp. Chromatogr. Electrophor., Lect. Pap., 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 396.  
 344. *Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W.*, J. Chromatogr., **17**, 99 (1965).  
 345. *Ibid.*, **9**, 316 (1962).  
 346. *Pallotta U., Matarese L.*, Riv. Ital. Sostanze Grasse, **40**, 579 (1963).  
 347. *Pallotta U., Matarese L.*, Riv. Ital., Sostanze Grasse, **41**, 210 (1964).  
 348. *Mani V. V. S., Lakshminarayana G.*, Indian J. Technol., **3**, 339 (1965).  
 349. *Srinivasulu C., Mahapatra S. N.*, J. Chromatogr., **86**, 261 (1973).  
 350. *Pantulu P. C., Murphy M. K. R., Rao M. B.*, J. Oil Technol. Assoc. India, **6**, 23 (1974).  
 351. *Shrivastava R. K., Bhutey P. G.*, Indian Oil Soap J., **31**, 164 (1966).  
 352. *Kaimal T. N. B., Mani V. V. S., Achaya K. T., Lakshminarayana G.*, J. Chromatogr., **100**, 243 (1974).

353. *Biernoth G.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **69**, 635 (1967).  
 354. *Gracian Tous J., Martel J.*, Grasas Aceites (Seville, Spain), **26**, 207 (1974).  
 355. *Gulfinger T., Letan A.*, J. Agric. Food Chem., **21**, 1120 (1973).  
 356. *Cocks L. V., van Rede C.*, "Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts", Academic Press, London, 1966, p. 78.  
 357. *Cerbulis J., Zittle C. A.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **67**, 273 (1965).  
 358. *Ristrow R.*, Dtsch. Lebensm. Rundsch., **64**, 322 (1968).  
 359. *Pokorný J., Janicek G.*, Nahrung, **11**, 381 (1967).  
 360. *Payne E.*, J. Sci. Food Agric., **22**, 20 (1971).  
 361. *Mani V. V. S., Lakshminarayana G.*, Chromatogr. Rev., **10**, 159 (1968).  
 362. *Gracián J., Martel J.*, Grasas Aceites (Seville, Spain), **13**, 128 (1962), Chem. Abstr., **58**, 7050 (1963).  
 363. *Acker L., Greve H.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 1009 (1963).  
 364. *Purdy S. J., Truter E. V.*, Nature, **190**, 554 (1961).  
 365. *Purdy S. J., Truter E. V.*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser., B., **158**, 586 (1963).  
 366. *Purdy S. J., Truter E. V.*, Proc. Roy. Soc. (London), **544** (1963).  
 367. *Purdy S. J., Truter E. V.*, Proc. Roy. Soc. (London), **553** (1963).  
 368. *Thirkell D., Tristram G. R.*, J. Sci. Food Agric., **14**, 488 (1963).  
 369. *Curri S. B.*, Anthol. Med. Santoriana, **69**, 100 (1963); Chem. Abstr., **60**, 14335 (1964).  
 370. *Miller J. M., Kirchner J. G.*, Anal. Chem., **24**, 1480 (1952).  
 371. *Carroll K. K.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 413 (1963).  
 372. *Daemen F. J. M., de Haas G. H., van Deenen L. L. M.*, Rec. Trav. Chim., **82**, 487 (1963).  
 373. *Hirsch J.*, Federation Proc., **20**, 269 (1961).  
 374. *Mahadevan V., Lundberg W. C.*, J. Lipid Res., **3**, 106 (1962).  
 375. *Zoellner N.*, Z. Klin. Chem., **1**, 18 (1963).  
 376. *van Deenen L. L. M., de Gier J., de Haas G. H.*, Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Proc., Ser. B, **64**, 528 (1961).  
 377. *Gauglitz E. J. Jr., Malins D. G.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 425 (1960).  
 378. *Gauglitz E. J. Jr., Lehman L. W.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 197 (1963).  
 379. *van Deenen L. L. M., de Haas G. H.*, Biochem. Biophys. Acta, **70**, 538 (1963).  
 380. *Applewhite T. H., Nelson J. S., Goldblatt L. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **45**, 101 (1963).  
 381. *Kaufmann H. P., Sen Gupta A. K.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 529 (1963).  
 382. *Kaufmann H. P., Hamsagar R. S.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **64**, 206 (1962).  
 383. *Kaufmann H. P., Schickel R.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 1012 (1963).  
 384. *Kaufmann H. P., Viswanathan C. V.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **67**, 7 (1965).  
 385. *Tuna N., Mangold H. K., Mosser D. G.*, J. Lab. Clin. Med., **61**, 620 (1963).  
 386. *Kaunitz H., Gauglitz E. Jr., McKay D. G.*, Metabolism., **12**, 371 (1963).  
 387. *Kaunitz H., Malins D. C., McKay D. G.*, J. Exp. Med., **115**, 1127 (1962).  
 388. *Horning E. C.*, Mal. Cardiovasculari, **4**, 7 (1963).  
 389. *Jaky M., Koranyi A., Hagony P. L.*, Nahrung, **8**, 105 (1964).  
 390. *Peifer J. J., Janssen F., Muesing R., Lundberg W. O.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 292 (1962).  
 391. *Letters R.*, J. Inst. Brewing, **68**, 318 (1962).  
 392. *Hughes D. H.*, Proc. Intern. Conf. Sci. Aspects Mushroom Growing, 5th, Philadelphia, 1962, 540, Chem. Abstr., **60**, 13576 (1964).  
 393. *McKillican M. E., Sims R. P. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 108 (1963).  
 394. *Gunstone F. D., Padley F. B., Qureshi M. I.*, Chem. Ind. (London), **1964**, 483.  
 395. *Debuch H., Mertens W., Winterfeld M.*, Z. Physiol. Chem., **349**, 896 (1968).  
 396. *Rouser G., Kritchevsky G., Mhatley M., Baxter C. F.*, Lipids, **1**, 107 (1966).

## Глава XXIV

### НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И НУКЛЕОТИДЫ

В этой главе введены следующие сокращения: AMP — аденозинмонофосфат, ADP — аденозиндифосфат, АТР — аденозинтрифосфат, DPN — дифосфопиридиннуклеотид, TPN — трифосфопиридиннуклеотид, DPNH — восстановленный дифосфопиридиннуклеотид, TPNH — восстановленный трифосфопиридиннуклеотид, UDPглюкоза — уридиндифосфатглюкоза, GMP — гуанозинмонофосфат, CMP — цитидинмонофосфат, UMP — уридинмонофосфат, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК — рибонуклеиновая кислота, IMP — инозинмонофосфат, TMP — тимидинмонофосфат, ADPглюкоза — аденозиндифосфатглюкоза, CDPманноза — гуанозиндифосфатманноза, CDPглюкоза — цитидиндифосфатглюкоза, UDPглюкоза — уридиндифосфатглюкоза, UDPглюкуроновая кислота — уридиндифосфатуруновая кислота, UDPацетилглюкозамин — уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин. Приставка d означает дезоксирибонуклеотид.

Патаки [1], а также К. Рандерат и Э. Рандерат [1a] опубликовали обзоры по ТСХ нуклеозидов, нуклеотидов и оснований нуклеиновых кислот, а Шейту [2] принадлежит обзор по ТСХ олигонуклеотидов. Саукконен [3] обобщил данные работ по методам хроматографии свободных нуклеотидов.

#### 1. РАЗДЕЛЕНИЕ НА СЛОЯХ СИЛИКАГЕЛЯ

Рандерат [4] разделял на слоях силикагеля G основания и нуклеозиды, применяя в качестве элюирующего растворителя дистиллированную воду. В некоторых случаях он закреплял слой силикагеля коллодием, а не гипсом, так как кальций может давать устойчивые комплексы [5]. Шейг и др. [6] анализировали окисленные и восстановленные дифосфопиридиннуклеотид (DPN) и трифосфопиридиннуклеотид (TPN) на слоях силикагеля G, элюируя пробу смесью изомасляная кислота—гидроксид аммония—вода (66:1:33). Эти же соединения разделяли также смесью этанол—1 М раствор ацетата аммония (7:3), рН 7,5. Смесью тех же компонентов, но при соотношении 1:1, не удается разделить окисленный и восстановленный трифосфопиридиннуклеотид.

Керри и Маффи [7] изучали смесь мочевой кислоты, ксантина, гипоксантина и 6-меркаптопурина в атмосфере паров насыщенного водой бутанола, содержащего 2,5 %-ную добавку аммиака. Растворителем служил насыщенный водой бутанол. Эти авторы разделили также смесь гуанозина, инозина и аденозина и отделили цитидин от уридина.

Используя восемь различных смесей растворителей, Массалья и др. [8] хроматографировали на слоях силикагеля, а также целлюлозы группу пиримидинов и их производных нуклеозидов, меченных радиоактивным иодом.

Томашевский и др. [9] привели величины  $R_f$  35 циклических нуклеотидов, нуклеозидов, пуринов, пиримидинов и нуклеотидов, полученных при элюировании растворителями на основе ацетонитрила, а именно различными смесями ацетонитрила с *n*-бутанолом, 0,1 М раствором ацетата аммония и 28 %-ным раствором гидроксида аммония. Продолжительность элюирования составляла от 18 до 81 мин. В этой работе даны также результаты хроматографирования на микрокристаллической целлюлозе с применением тех же растворителей.

Для разделения на силикагеле были использованы растворители различного состава, в том числе смеси хлороформ—пиридин—метанол (18:1:1 и 8:1:1), изопропанол—аммиак—вода (7:1:2), хлороформ—метанол (9:1 и 7:3) [10]; изопропанол—аммиак—вода (6:3:1), *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (5:2:3) [11]; этанол—метанол—0,1 М раствор додецилсульфата натрия (от 5:2:3 до 1:6:3), этанол—метанол—0,1 М раствор ацетата аммония (5:2:3) [12]; *трет*-бутанол—метилэтилкетон—муравьиная кислота—вода (2:2:0,1:1), метанол—хлороформ—триэтиламин (4:6:0,5) [13]; этилацетат и смесь этилацетат—метанол (9:1) [14].

Соединения рассматриваемой группы анализировали также двумерным хроматографированием на силикагеле. Каде и Теуль [15] разделили 54 нуклеозиды и их производных, используя для первого элюирования нижний слой смеси хлороформ—метанол—вода (4:2:1), к которому добавили еще 5 % метанола, а для второго элюирования — смесь этилацетат—изопропанол—вода (75:16:9). Виммер и Райхман [16] элюировали пробы смесью изопропанол—аммиак—вода (7:1:2) или *n*-бутанол—*n*-пропанол—аммиак—вода (65:5:10:20) в первом направлении и насыщенным водой бутанолом — во втором. Дезоксирибонуклеотиды разделяли, элюируя смесью *n*-пропанол—аммиак—вода (3:1:1) в первом направлении и смесью изомасляная кислота—1 М раствор гидроксида аммония—0,1 М раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (100:60:1,6) [17].

Манс и Симс [18] применили двумерное непрерывное элюирование на слое из силикагеля и микрокристаллической

целлюлозы, взятых в соотношении 2:3, для разделения смеси 17 метилированных нуклеозидов. Первое элюирование проводили в течение 150 мин смесью этилацетат—метанол—вода—88 %-ная муравьиная кислота (100:25:20:1), далее хроматограмму сушили, после чего пробу элюировали еще 150 мин во втором направлении смесью ацетонитрил—этилацетат—втор-пропанол—*n*-бутанол—58 %-ный гидроксид аммония—вода (40:30:20:10:22:5). Растворитель удаляли с помощью фильтровальной бумаги, чтобы процесс хроматографирования был непрерывным.

Циклический аденозин-3',5'-монофосфат отделяли от других производных аденина [19] на силикагеле, пропитанном тетраборатом, в таких же условиях отделяли циклический гуанозин-3',5'-монофосфат от других производных гуанина [20].

Гаврилшин и др. [21] исследовали группу фторпиримидинов и фторнуклеозидов. Они получили величины  $R_f$  на силикагеле GF с 12 различными растворителями. Посредством двумерного хроматографирования с элюированием в первом направлении смесью этилацетат—ацетон—вода (7:4:1), а во втором направлении смесью этилацетат—метанол—гидроксид аммония (75:25:1) удалось разделить 10 соединений.

## 2. РАЗДЕЛЕНИЕ НА ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Рандерат [4], а также Рандерат и Страк [22] применяли тонкие слои целлюлозы, приготовленные размешиванием 10 г порошка целлюлозы MN-300 в 50—60 мл ацетона. Никакое закрепляющее вещество не добавлялось. На таких слоях удалось разделить нуклеиновые основания и нуклеозиды, используя в качестве элюирующего растворителя воду. Нуклеотиды разделяли смесью *n*-бутанол—ацетон—уксусная кислота—5 %-ный раствор гидроксида аммония—вода (4,5:1,5:1:1:2).

Ди Жезо [23], проводивший хроматографирование фосфатов и продуктов их гидролиза, производных гуанидина и ортофосфатов, избегал применения алебаstra в качестве связующего в слоях целлюлозы, чтобы исключить возможные помехи при хроматографировании фосфатных соединений основными растворителями.

Рандерат [24] непосредственно сравнивал результаты разделения производных нуклеиновых кислот на бумаге и на закрепленных алебастром тонких слоях целлюлозы, осуществленного в идентичных условиях. В четырех испытанных растворителях—вода—насыщенный раствор сульфата аммония—1 М раствор ацетата натрия—изопропанол (40:9:1), *трет*-амиловый спирт—муравьиная кислота—вода (3:2:1), *n*-бутанол—ацетон—уксусная кислота—5 %-ный раствор гидроксида аммония—вода

(3,5:2,5:1,5:1,5:1) — разделение на тонких слоях целлюлозы было лучше, чем на бумаге, по разрешению и четкости пятен или же происходило быстрее, а в некоторых случаях лучшими были все показатели. Например, при использовании растворителя с *трет*-амиловым спиртом на тонких слоях адсорбента удается четко разделить моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов, тогда как методом хроматографии на бумаге ди- и трифосфаты разделить нельзя. С растворителем на основе *n*-бутанола степень разделения сравнима, но на тонких слоях хроматографирование длится 90 мин, а на бумаге 6—8 ч.

Рандерат [25] анализировал основания нуклеиновых кислот на адсорбционных слоях целлюлозы методом двумерного элюирования, используя в качестве элюентов смеси метанол—соляная кислота—вода (7:2:1) и *n*-бутанол—метанол—вода—оксид аммония (60:20:20:1). Позднее К. Рандерат и Э. Рандерат [26] применили двумерное разделение для определения состава оснований и путем последующего введения химической метки, содержащей тритий, установили последовательность их в РНК. Для разделения сложных смесей производных нуклеозидов и триолов и наборов меченой РНК использовали следующие растворители: для первого элюирования на расстоянии 17 см смесь ацетонитрил—этилацетат—*n*-бутанол—изопропанол—6 н. раствор аммиака (7:2:1:1:2,7), для второго элюирования на расстоянии около 22,5 см—смесь *трет*-амиловый спирт—метилэтилкетон—ацетонитрил—этилацетат—вода—муравьиная кислота (4:2:1,5:2:1,5:0,18). Чтобы можно было провести второе элюирование, на хроматограмме закрепляли тампон из фильтровальной бумаги. Растворители, содержащие ацетонитрил, дают очень хорошее разделение.

Рандерат и др. [27] нашли также, что на слоях волокнистой целлюлозы типа MN-300 (листки целлюлозы Baker-flex № 4468) разделение идет лучше, чем на слоях микрокристаллической целлюлозы. В этом случае в первом направлении пробу элюировали смесью ацетонитрил—4 н. раствор гидроксида аммония (3,4:1). Наранг и Михневич [28] исследовали возможность разделения синтетических полидезоксирибонуклеотидов на микрокристаллических адсорбционных слоях двумерным элюированием смесью изопропанол—5 %-ный раствор гидроксида аммония (2:1) в одном направлении и смесью изомасляная кислота—1 М раствор гидроксида аммония—0,1 М раствор EDTA (100:60:1,6 или 75:60:1,6) — в другом.

В число пар растворителей, предназначенных для двумерного элюирования на слоях целлюлозы, входят следующие смеси: *n*-бутанол—вода (43:7) и изопропанол—соляная кислота—вода (170:41:39) [29], *трет*-бутанол—метилэтилкетон—вода—гидроксид аммония (4:3:2:1) и изопропанол—вода—соляная

кислота (65:18,4:16,6) [30], а также изомасляная кислота—0,5 М раствор аммиака (5:3) и *трет*-бутанол—раствор формиата аммония (1:1), рН 3,8 [31].

В работе [32] приведены величины  $R_f$  26 производных пурина и 22 производных пиримидина, полученные при хроматографировании на целлюлозе с 6 различными растворителями. Для одномерного хроматографирования наилучшие результаты дали следующие системы: изомасляная кислота—0,5 н. раствор аммиака (10:6) и смесь 0,1М фосфатный буферный раствор (рН 6,8)—насыщенный раствор сульфата аммония—*n*-пропанол (50:30:1). Холгин-Юэзо и Кардино [33] свели в таблицу величины  $R_f$  60 пуриновых оснований и дезоксирибонуклеозидов и 29 пиримидиновых оснований и дезоксирибонуклеозидов для 6 различных растворителей.

Изомерные метилированные дезоксигуанозины, полученные при действии diazometana на дезоксигуанозин, удалось разделить на слоях целлюлозы, закрепленных алебастром [34], 1-метилдезоксигуанозин и О-метилдезоксигуанозин характеризуются величинами  $R_f$  0,70 и 0,78 соответственно при элюировании смесью изопропанола и воды (7:3) и 0,72 и 0,80 при элюировании смесью изопропанола, воды и аммиака (70:25:5).

Кек и Хаген [35] применили двумерную комбинацию электрофореза и хроматографии для разделения смеси дезоксинуклеотидов, дезоксинуклеозидов и оснований. Электрофорез проводили на слое целлюлозы, опрысканном 0,05 М формиатным буферным раствором с рН 3,4. При температуре 0°C, напряжении 15 000 В и токе 25 мА разделение заканчивается через 30 мин. Далее пластинку сушат и элюируют пробу на 10 см смесью насыщенного раствора сульфата аммония, 1 М раствора цитрата натрия и изопропанола (40:9:1). Положение пятен различных соединений определяют визуально при УФ-облучении.

Белеский [36] описал методику двумерного разделения фосфатных эфиров путем сочетания хроматографии и электрофореза. Сначала он хроматографировал пробу смесью *n*-пропанол—раствор гидроксида аммония (уд. масса 0,90)—вода (6:3:1), к которой добавляли ЭДТА в количестве 2 г на литр, после чего проводил электрофорез в буферном растворе ацетата аммония с рН 3,6. При напряжении 1000 В и силе тока 35 мА разделение длилось 16 мин. Для разделения гидролизатов РНК Белеский пользовался 0,13 М буферным формиатным раствором с рН 3,4. Гассен [37] применил эту методику для снятия «отпечатков пальцев» олигонуклеотидов и получил хорошие результаты вплоть до пентануклеотидов. Мандри и Присс [38] изучали картину распределения олигонуклеотидов. Сначала они проводили электрофорез в 20 %-ном растворе уксусной кислоты с добавкой 8 % формамида и аммиака (до рН 3,5) при силе тока

20 мА и напряжении 750 В. После чего элюировали пробу смесью электрофорезного буферного раствора и *трет*-бутанола (1:1), к которой добавляли аммиак до рН 4,5. Разделенные олигонуклеотиды элюировали с адсорбционного слоя, гидролизировали и вновь подвергали электрофорезу, с тем чтобы разделить продукты гидролиза. Количественный анализ проводили по автордиографическим снимкам, полученным посредством

Таблица 24 I

Величины  $R_f \times 100$  свободных оснований и нуклеозидов в различных хроматографических системах<sup>а б</sup>

Соединение	А			Б	В			Г	
	а	б	в	г	г	д	е	г	е
Аденин	29	30	38	98	20	33	44	14	13
Гуанин	33	37	38	73	10	31	40	23	0
Гипоксантин	46	55	57						
Урацил	73	72	75	74	26	66	75	62	68
Цитозин				92	26	80	90	50	56
Тимин				83	41	74	85	52	54
Аденозин	56	53	75	91 <sup>в</sup>	68	58	62		
Гуанозин	50	58	80	59 <sup>в</sup>	13	31 <sup>г</sup>	39 <sup>г</sup>		
Инозин	61	70	82						
2-Дезоксиаденозин				97 <sup>в</sup>	66	70	70		
2-Дезоксигуанозин				73 <sup>в</sup>	12	40	50		
2-Дезоксицитидин				90 <sup>в</sup>	93	82	90		
Цитидин	82	80	76	78 <sup>в</sup>	96	79	94		
Тимидин				81 <sup>в</sup>	49	81	90		
Уридин	84	81	85	63 <sup>в</sup>	30	68	87		

<sup>а</sup> Растворители: А — вода [1], Б — изомасляная кислота—гидроксид аммония (уд. масса 0,90)—вода (33:1:16), длина пути элюирования 152 мм [45], В — 0,005 н соляная кислота, длина пути элюирования 152 мм [45], Г — насыщенный раствор сульфата аммония—1 н раствор ацетата натрия—изопропанол (40:9:1), длина пути элюирования 152 мм [45]

<sup>б</sup> Адсорбенты а — ЕСТЕОЛА-целлюлоза, б — целлюлоза; в — силикагель G, г — DEAE-целлюлоза, д — DEAE-целлюлоза с добавкой 5 % сульфата кальция, е — DEAE-целлюлоза с добавкой 10 % сульфата кальция

<sup>в</sup> С добавкой 10 % сульфата кальция

<sup>г</sup> Образование прожилок

введения в пробу меченной фосфором-32 РНК вируса табачной мозаики

В табл. 24.1 приведены величины  $R_f$  нуклеозидов и оснований в различных хроматографических системах.

Тиэхак [39] предложил специфическую цветную реакцию для обнаружения аденина в хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии. Аденилпурины в количествах от 0,01 до 0,05 мкмоль можно обнаружить с помощью реактива Т-273 (см. ч. 1, гл. 6) [40]. Присутствие пуринов можно также обнаружить, погружая хроматограмму в жидкий азот и рассматривая ее сразу после извлечения в коротковолновом УФ-свете [41]. Чувствительность этого способа обнаружения измеряется наномолями, но фосфоресценция длится всего несколько секунд.

### 3. РАЗДЕЛЕНИЕ НА МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

#### Диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE-целлюлоза)

Рандерат [42, 43] показал эффективность применения этого ионообменного вещества для разделения нуклеотидов. Довольно хорошее разделение на нем получено с 0,02 н. соляной кислотой. Аденозиндифосфат (ADP) нельзя отделить от 5'-уридинмонофосфата (UMP), а цитидиндифосфат (CDP) в какой-то степени перекрывает зоны этих двух соединений. Чтобы разделить эти соединения, которые остаются вблизи стартовой линии, можно провести элюирование 0,03 н. соляной кислотой. Этот элюат позволяет добиться лучшего разрешения СТР, UDP, АТР, ГТР и УТР, хотя пятна в какой-то степени перекрываются. Хорошее разделение трифосфатов получают при повышении концентрации элюирующего растворителя до 0,04 н. и удлинении пути хроматографирования от примерно 9 до 12,8 см. Дайер [44] использовал двустадийное элюирование для разделения гуаниловой, уридиловой, адениловой и цитидиловой кислот — продуктов щелочного гидролиза рибонуклеиновой кислоты. Перечисленные соединения были получены в результате 18-часового гидролиза РНК дрожжей или проростков ржи 0,3 н. раствором гидроксида калия при 37°C. Гидролизат освобождали затем от калия, пропуская через катионообменную смолу или осаждая калиевую соль хлорной кислотой. Первое элюирование проводили смесью 1-пропанол—раствор гидроксида аммония (уд. масса 0,880)—вода (6 : 3 : 1) при 40°C на расстояние 7 см

Обычный reagent-grade гидроксид аммония для этой цели не пригоден, если не выдерживать растворитель до следующего дня. Свежеприготовленная смесь дает удовлетворительные результаты, если в нее введен гидроксид аммония AnalaR, [фирма E. Merck, Ltd.]. После первого элюирования пластинку сушили и

затем помещали в 0,24 М раствор уксусной кислоты при 20—25°C, которым элюировали на такое же (7 см) расстояние. В результате получены следующие величины  $R_f$ : гуаниловая кислота 0,21; уридиловая кислота 0,34, цитидиловая кислота 0,82 и адениловая кислота 0,53 и 0,62 (2'- и 3'-фосфаты последней).

Коффи и Ньюбург [45] изучали влияние изменения содержания сульфата кальция в качестве связующего в слоях DEAE-целлюлозы и обнаружили, что величины  $R_f$  (табл. 24.1) почти всех исследованных соединений сильно меняются, если в качестве растворителя используется соляная кислота. Наилучшее общее разделение рибонуклеотидов авторы работы [45] получили со смесью изомасляная кислота—раствор гидроксида аммония (уд. масса 0,90)—вода (33 : 1 : 16), однако лучшее разрешение зон 2'-фосфата и изомерного ему 3'-фосфата они достигли при элюировании пробы 0,005 н. соляной кислотой на слое DEAE-целлюлозы, закрепленной 10 % сульфата кальция. Поскольку гуаниловая кислота при  $pH < 10$  проявляет сильную тенденцию к образованию прожилков, монорибонуклеотиды растворяли в 0,1 н. растворе гидроксида аммония. Наилучшие условия для разделения дезоксирибонуклеотидов — сочетание DEAE-целлюлозы с 10 % сульфата кальция в качестве связующего и того же растворителя, что и для разделения рибонуклеотидов. Добавляя сульфат кальция к адсорбенту, удается отделить 2-дезоксцитидин-5'-фосфат от 2-дезоксаденозин-5'-фосфата; при хроматографировании на слое без связующего зоны этих соединений перекрываются. Для разделения смесей, содержащих как рибо-, так и дезоксирибонуклеозиды, наилучшим оказалось сочетание разбавленной 0,005 н. соляной кислоты со слоями DEAE-целлюлозы без добавки связующего. При использовании связующего (сульфата кальция) величины  $R_f$  уридина и тимидина возрастали настолько, что их пятна перекрывались с пятнами цитидина и 2-дезоксцитидина. Нуклеозиды наносили на пластинку из раствора в нейтральном растворителе. Свободные основания в виде раствора в 0,1 н. соляной кислоте лучше всего разделялись растворителем Рандерата [42] на адсорбционных слоях DEAE-целлюлозы, не содержащих сульфата кальция.

Для двумерного хроматографирования Коффи и Ньюбург [45] рекомендуют соляную кислоту и дистиллированную воду для элюирования в первом направлении; если же в первом направлении пробу элюируют изобутиратом, то во втором направлении можно использовать воду, но не соляную кислоту. Поскольку солей приводит к образованию прожилков, пробы обессоливали на колонке с древесным углем. Свенсен [46] извлекал соли из пробы, нанесенной на слой DEAE-целлюлозы, проводя

предварительное элюирование водой. Стиклэнд [47] разделял моно-, ди- и трифосфаты аденозина, цитидина, гуанозина и уридина методом двумерной хроматографии на DEAE-целлюлозе, используя в качестве растворителей растворы бикарбоната и формиата аммония. Мешающие разделению нуклеотидов примеси удаляли при предварительном хроматографировании на двухслойной пластинке, первая четверть которой была покрыта смесью дауэкса-1 и сефадекса-25, а уравнивающая часть пластинки содержала только сефадекс. Величины  $R_f$  относительно СМР даны в виде таблицы [48].

Лапидо и др. [49] разделили на слоях DEAE-целлюлозы 16 рибонуклеотидил (2'→5') рибонуклеозидов и их 3'→5'-изомеров. Все аденил- и гуанилизомеры разделяли 0,1 н. раствором бикарбоната аммония. Для разделения динуклеозидмонофосфатов типа C—N и U—N требовались различные концентрации бикарбоната аммония.

Ярошевич и др. [50] применяли с целью разделения нуклеотидов 0,08 н. соляную кислоту для элюирования в первом направлении при 4°C и смесь насыщенного раствора сульфата аммония, 1 М раствора ацетата натрия и изопропанола (80:18:2) для элюирования во втором направлении при комнатной температуре. Перед вторым элюированием необходимо удалить кислоту, для чего проводят предварительное элюирование 8 %-ным ацетоновым раствором триэтиламина и ацетоном (трижды). Гриппо и др. [51] использовали для разделения нуклеотидов, нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот различные комбинации растворителей, в том числе следующие их пары: а) 0,02 н. соляную кислоту и б) смесь 95 %-ного этанола и насыщенного тетраборатом 1 М раствора ацетата аммония в соотношении 1:1; а) 0,04 н. соляную кислоту и такую же, как указанная выше, смесь; а) 0,005 н. соляную кислоту и б) 0,035 н. соляную кислоту и а) 0,05 н. соляную кислоту и б) 0,02 н. соляную кислоту.

Кирнос и др. [51а] описали методику линейного градиентного элюирования раствором хлорида натрия, концентрация которого в 0,01 М буферном растворе ацетата натрия (рН от 5,1 до 5,3) менялась от нуля до 0,35 М; для фракционирования дезоксирибонуклеотидов на отдельные изолизы (группы олигонуклеотидов с одинаковым числом нуклеотидных остатков) авторы применяли 5 М раствор мочевины. Пурины двигались вблизи фронта растворителя, а по числу пиримидиновых фрагментов совершалось четкое разделение на моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и гептануклеотиды. Можно также использовать ступенчатое градиентное элюирование. С целью разделения пиримидиновых нуклеотидов по составу отдельные изолизы элюировали с пластинок и наносили их в виде пятен на другой слой DEAE-целлю-

лозы для разделения с тем же градиентом концентрации хлорида натрия, но с буферным раствором с рН 3,2.

### ЕСТЕОЛА-целлюлоза

Рандерат [4, 5, 52] первым применил это ионообменное вещество для разделения компонентов смеси нуклеиновых кислот методом ТСХ. Элюирование велось дистиллированной водой, 0,15 М раствором хлорида натрия и 0,01 н. соляной кислотой. При двумерном разделении пробу элюировали сначала раствором хлорида натрия, а затем во втором направлении разбавленной соляной кислотой. При этом достигалось не только фракционирование моно-, ди- и трифосфатов по группам, но и дополнительное фракционирование внутри этих групп [42]. Найяр [53] разделил 5'-AMP, 5'-ADP и 5'-ATP на ЕСТЕОЛА-целлюлозе MN-300 с сульфатом кальция в качестве связующего, элюируя пробу смесью трет-бутанол—90 %-ная муравьиная кислота—вода (5:4:5). До нанесения исходных образцов пластинки предварительно элюировали тем же растворителем. Результаты разделения качественно оценивали, измеряя поглощение элюата при длине волны 259 нм. Пятна с пластинки элюировали подкисленной водой (три капли 1 н. соляной кислоты на 5 мл воды).

Бауэр и Мартин [54] использовали растворитель, представлявший собой смесь 1 М раствора гидроксида аммония и 2 М раствора хлорида натрия с добавкой 0,01 М раствора фосфата (рН 11,0), для хроматографирования дезоксирибонуклеиновой кислоты из зубной железы теленка. Образец наносили на пластинку в виде раствора в 0,01 М фосфатном буферном растворе (рН 7). Перед хроматографированием пластинки предварительно смачивали, элюируя на 1,5 см элюирующим растворителем. В противном случае ДНК остается в исходной точке.

Пантелеева [55] сообщила о разделении 16 нуклеотидов при элюировании соляной кислотой с концентрацией от 0,01 до 0,07 н. Как и в большинстве случаев, полученные пятна она наблюдала в УФ-свете.

Дитрих и др. [56] анализировал нуклеотиды, а также некоторые фосфаты сахаров на слоях ЕСТЕОЛА-целлюлозы, пропианной тетраборатом аммония. Просеянный порошок (2 г) ЕСТЕОЛА-целлюлозы (Serva-Entwicklungslabor) смешивали с 18 мл 0,004 М раствора EDTA. Полученную кашку наносили на пластинки, сушили при комнатной температуре примерно 12 ч и опрыскивали 0,1 М раствором тетрабората аммония. (Примечание. Тетраборат аммония нельзя вводить в состав кашицы.) Приготовление хроматографических пластинок заканчивали 30-минутной их сушкой при 50°C. Разделение нуклеотидов

Таблица 24.2

Величины  $R_f \times 100$  нуклеотидов, полученные на ЕСТЕОЛА- и DEAE-целлюлозе с различными растворителями

Нуклеотид	ЕСТЕОЛА-целлюлоза			DEAE-целлюлоза со связующим		DEAE-целлюлоза			
	0,15 М NaCl [4]	0,01 н. HCl [4]	95%-ный этанол — 0,1 М тетраборат аммония, pH 9,0 (3:2); длина пути 17 см [56] а	5 % CaSO <sub>4</sub>	10 % CaSO <sub>4</sub>	соляная кислота [42]			
				0,005 н соляная кислота; длина пути 152 мм [45]		изометрическая кислота — NH <sub>4</sub> OH (уд. масса 0,90) вода (83:1:16); длина пути 152 мм [45]			
					0,01 н.	0,02 н.	0,03 н.	0,04 н.	
5'-AMP	57	26	42			45	65		
AMP									
3'-AMP	48			4	21	63			
2'-AMP				4	32	63			
ADP	36	8	36			24	48	68	
ATP	21		32			6	11	20	56
5'-CMP	74	31				46	65		
3'-CMP	71			5	50	51			
2'-CMP				9	61	55			
CDP	51	11				31	53		
CTP	34					9	13	31	64
5'-GMP	55	14							
3'-GMP	44								
GDP	37	3							
GTP	17								
5'-IMP	74								
5'-TMP				5	48	47			
TMP			110						
5'-UMP	80	13							
UMP			53						
3'-UMP	75			2	42	36			
2'-UMP				2	48	36			
UDP	63	0	42			7	15	25	
UTP	44		37			4	4	8	18
2-d-5'-AMP				4	28	61			
2-d-5'-GMP				2	15	35			
2-d-5'-CMP				8	18	60			

а Величины  $R_f \times 100$ , определенные относительно неорганического фосфата. Адсорбент опрыскивали 0,1 М раствором тетрабората аммония (pH 9,0) и сушили перед элюированием

сахаров проводили смесью 95 %-ного этанола и 0,1 М раствора тетрабората аммония (pH 9,0), взятых в соотношении 3:2 или 1:1. Смесью с соотношением компонентов 3:2 применяли также для разделения фосфатов сахаров. В табл. 24.2 приведены величины  $R_f$  нуклеотидов, полученные на DEAE- и ЕСТЕОЛА-целлюлозе.

### Полиэтиленминцеллюлоза (PEI-целлюлоза)

Рандерат [57] ввел в практику также применение PEI-целлюлозы. Хорошие результаты разделения моно- и дифосфатов урацила, цитозина, аденина и гуанина получены в результате двухстадийного элюирования 0,6 М раствором хлорида натрия на первой стадии, продолжавшейся 5 мин, и 0,8 М раствором хлорида натрия на второй стадии при длине пути элюирования 6,6 см. Между двумя элюированиями пластинку не сушили. Соответствующие трифосфаты разделяли одностадийным элюированием 1,25 М раствором хлорида натрия при длине пути элюирования 5,5 см. На PEI-целлюлозе разделение было более четким, чем на ЕСТЕОЛА- и DEAE-целлюлозе. Чувствительность разделения на PEI-целлюлозе выше, особенно в отношении малых количеств, так что в общем этот метод приблизительно в 50 раз более чувствительный, чем хроматографирование нуклеотидов на бумаге.

Дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты и щелочные гидролизаты рибонуклеиновой кислоты из дрожжей анализировали методом двумерной хроматографии [58]. Чтобы удалить примеси из адсорбента, слой PEI-целлюлозы элюировали на расстояние 5 см 10 %-ным раствором хлорида натрия. Сейчас же вслед за этим помещали слой в растворитель — воду и элюировали дважды до самого верха. После сушки при комнатной температуре слой готов для хроматографирования. Многостадийное хроматографирование предусматривает элюирование водой вплоть до начальной линии, затем 1 н. муравьиной кислотой (без промежуточной сушки) на расстояние 10 см и, наконец, элюирование 60 %-ным насыщенным раствором сульфата аммония во втором направлении на расстояние 8 см. Перед элюированием разделенных соединений со слоя адсорбента пластинку вымачивали в метаноле 15 мин, чтобы удалить избыточные соли, затем сушили и элюировали с нее разделенные соединения 60 %-ным насыщенным раствором сульфата аммония.

Фостер и др. [59] разработали методику удаления примесей солей из образцов нуклеотидов, нанесенных на слой PEI-целлюлозы. Раствор образца в 10 мл воды пропускали через капилляр и наносили на адсорбционный слой, который вблизи от стартовой линии соприкасался с фитилем из фильтровальной бумаги.

Воду вместе с растворенными в ней солями извлекали фильтровальной бумагой, а образец при этом концентрировался в начальном положении. Чтобы избежать затруднений, связанных с наличием солей, и в то же время избежать потери части пробы при промывке метанолом [58], Сантини и Ульрих [60] использовали для первого элюирования летучий растворитель; они получали максимальное разрешение нуклеотидов при элюировании 0,1 н. муравьиной кислотой (рН 3,6). Во втором направлении элюирование велось 1 М раствором хлорида лития (рН 7,0). Эти авторы нашли также, что для оптимального разрешения рН раствора пробы должен быть равен 3,5. Кенигк [61] избегал потери пробы в количественных опытах, добавив к растворителю EDTA для подавления влияния солей, вместо того чтобы проводить промывку метанолом. Назар и др. [61а] решили проблему влияния солей следующим образом. Нуклеотиды экстрагировали уксусной кислотой, затем экстракт лиофилизировали и разбавляли 0,6 мл холодной воды. После удаления воды (удаляли ее нагреванием) проба собиралась на небольшой площади.

Рандерат [62] отделял дезоксирибонуклеотиды от рибонуклеотидов, применяя растворы хлорида лития с добавкой борной кислоты, которая служила комплексообразующим агентом. В отсутствие борной кислоты величины  $R_f$  соответствующих пар соединений были одинаковыми. 5'-Монофосфаты разделяли элюированием смесью 2 %-ной борной кислоты и 2 М раствора хлорида лития (2 : 1), а нуклеозидтрифосфаты — смесью 4 %-ной борной кислоты и 4 М раствора хлорида лития (4 : 3). Для этих двух групп соединений получены следующие величины  $R_f$  [63]: AMP 0,24, d-AMP 0,42, GMP 0,08, d-GMP 0,30, CMP 0,28, d-CMP 0,55, UMP 0,37 и TMP 0,63 — все  $R_f$  для раствора 2 %-ной борной кислоты; ATP 0,33, d-ATP 0,46, GTP 0,17, d-GTP 0,37, CTP 0,36, d-CTP 0,61, UTP 0,48 и TTP 0,70 — все для раствора 4 %-ной борной кислоты. В указанных растворителях  $R_f$  ADP составляет соответственно 0,04 и 0,56.

Исследуя адениннуклеотиды и адениннуклеозиды головного мозга, Гонзалес и Джил [64] также пользовались растворителем, содержащим борную кислоту и хлорид лития. Якобсен и Кирхнер [65] отделяли рибонуклеозиды от дезоксирибонуклеозидов и арабинонуклеозидов на слоях PEI-целлюлозы, которую переворачивали в боратную форму, вымачивая 5 мин в 750 мл 0,4 М раствора триэтиламинтетрабората (99 г борной кислоты и 112 мл триэтиламина на литр раствора). Элюирующим растворителем служила смесь 0,1 М борной кислоты или 0,02 М раствора муравьинокислого аммония (рН 4,7) и этанола (1 : 1). Бюто и Симмонс [66] использовали, по существу, ту же методику для разделения двумерным хроматографированием нуклеозидов дезоксирибонуклеиновой кислоты. В первом направлении

пробу элюировали смесью 0,02 М раствора ацетата аммония (рН 4,8) и 95 %-ного этанола (1 : 1), а во втором направлении — 0,1 М борной кислоты.

К. Рандерат и Э. Рандерат [63] более полно исследовали влияние различных факторов на разделение нуклеотидов на тонких слоях PEI-целлюлозы. Они готовили слои, применяя ионообменные вещества собственного приготовления [67] (см. т. 1, гл. III, разд. 4), и полученные при этом данные отличаются от результатов, полученных на готовых пластинках. Емкость слоев толщиной 0,5 мм составляла приблизительно 1,5 мэкв. N/г целлюлозы (если слои готовили из недиализованного раствора полиэтиленimina, то емкость их была меньше — всего 0,7—0,8 мэкв. N/г целлюлозы). Чтобы оценить эффективность разделения, в слоях меняли содержание полиэтиленimina: 0,1 % дают плохую разрешающую способность, а 0,5 % — хорошую. Не следует применять концентрации выше 1,5 % (из диализованного раствора), поскольку при этом трудно освободиться от низкомолекулярных примесей. После сушки вдоль пластинок на расстоянии 4—5 мм от края пластинки проводили борозды, чтобы избежать краевого эффекта при элюировании. Кроме того, вдоль слоя проводили параллельные борозды шириной 0,5 мм и длиной 2 мм, процарапывали их с интервалом в 55 мм, начиная от стартовой линии по направлению к нижнему краю пластинки. Чтобы удалить примеси, не выведенные при диализе полиэтиленimina, пластинки предварительно элюировали дистиллированной водой и затем сушили при комнатной температуре не менее 12 ч. Пробы наносили в виде 0,002 М растворов натриевых или литиевых солей нуклеотидов в дистиллированной воде и, чтобы получить пятна, сушили 3 мин в токе холодного воздуха.

Исследовалась также зависимость величин  $R_f$  от концентрации хлорида лития в элюирующем растворителе. Величины  $R_f$  нуклеотидов менялись в зависимости от концентрации растворителя, а степень изменения зависела от типа разделяемых соединений, например какие соединения анализировались — ди- или моноэфиры. В то же время выяснилось, что  $R_f$  оснований нуклеиновых кислот, а также нуклеозидов не зависят от концентрации солей, если только концентрация последних не чрезмерно высока: в этом случае уменьшение  $R_f$ , по-видимому, вызывается высаливанием. Для улучшения разделения между различными группами нуклеотидов можно использовать многостадийное хроматографирование. Например, смесь нуклеотидов аденина и урацила элюируют раствором хлорида лития: 1 мин 0,1 М раствором, 5 мин 0,3 М раствором, 15 мин 0,7 М раствором и, наконец, 25 мин 1,5 М раствором. Элюирование проводят без промежуточной сушки, т. е. фактически осуществляется градиентное элюирование. Большое содержание солей мешает



разделению, поэтому перед хроматографированием образцы надо обессоливать. Хотя соли можно вывести, проводя адсорбцию на активном древесном угле, последующее извлечение пробы не является количественным, и по этой причине применяют более простой метод. Хроматографическую пластинку после нанесения пробы сушат, после чего погружают ее целиком на 10 мин в безводный химически чистый (reagent-grade) метанол, опять сушат и проводят обычное хроматографирование. При таком способе удаления избытка солей на пластинке остается более 90 % нуклеотидов.

Величины  $R_f$ , полученные для нуклеотидов на слоях PEI-целлюлозы в различных растворителях, приведены в табл. 24.3. Пользуясь таблицами для выбора подходящих растворителей в зависимости от состава разделяемых смесей, чаще всего удается подобрать такие смеси, которые позволяют добиться отличного разделения в две—пять стадий. Очень сложные смеси полинуклеотидов К. Рандерат и Э. Рандерат [68] анализировали методом двухстадийной анионообменной хроматографии на тонких слоях полиэтилениминцеллюлозы. Насколько эффективен этот метод, предполагающий многостадийное элюирование, показывает рис. 24.1. Сначала авторы [68] проводили элюирование пробы растворами хлорида лития различной концентрации: 2 мин 0,2 М раствором, затем сразу же (без промежуточной сушки) 6 мин 1,0 М раствором и в заключение 1,6 М раствором при общей длине пути элюирования 13,0 см. Все три элюирования велись в одном и том же направлении. После сушки в токе теплого воздуха при температуре  $< 50^\circ\text{C}$  часть слоя, не нужную для элюирования во втором направлении, соскребали с пластинки. Далее пластинку погружали на 15 мин в 1 л безводного метанола, чтобы удалить хлорид лития. (Время от времени метанол перемешивали, чтобы ускорить растворение солей.) После этого пластинку осторожно (в мягких условиях) сушили, чтобы удалить метанол, и затем элюировали в три стадии буферными растворами муравьиная кислота—формиат натрия (рН 3,4). Сначала элюировали 0,5 М раствором (30 с), затем 2,0 М (2 мин) и наконец 4,0 М при общей длине пути элюирования 15 см. Промежуточной сушки пластинки и в этом случае не проводили.

Раазн и Краус [69] сравнили результаты разделения на хроматографических пленках PEI-целлюлозы MN-330 и на слоях PEI-целлюлозы, приготовленных в лаборатории из целлюлозы MN-300, и нашли, что разделение на последних более эффективно. На этих слоях анализировались сложные смеси нуклеотидов и нуклеотидов. В результате получены две отдельные хроматограммы. Первое разделение проводили, элюируя пробу водой в одном направлении и смесью *n*-бутанол—метанол—вода—гидроксид аммония (60 : 20 : 20 : 1). Нуклеотиды при этом

Таблица 24.3

Величины  $R_f \times 100$  нуклеотидов, полученные на PEI-целлюлозе с различными растворителями. Длина пути элюирования 10 см [62] <sup>а</sup>

Соединение	Водный раствор LiCl, М			Буферный раствор HCOOH — HCOONa (рН 3, 4), М				1,0 н. HCOOH	2,0 н. HCOOH — 0,5 М LiCl (1 : 1)	2 н. HCOOH — 2,0 М LiCl (1 : 1)
	0,25	1,0	1,6	0,5	1,0	2,0	4,0			
5'-AMP	11	52	65	68 <sup>б</sup>	>80	>80	>80	>80	>80	>80
5'-IMP	13	59	74	40	60	73	80	19	53	78
5'-GMP	6	40	51	28	45	57	65 <sup>в</sup>	41	50 <sup>б</sup>	72 <sup>б</sup>
5'-CMP	15	64	75	70 <sup>б</sup>	>80	г		>80	>80	>80
5'-UMP	20	75	80	51	72	>80		20	64	80
ADP	0	26	54	3	10	32	75 <sup>в</sup>	3	29	70
IDP	0	30	63	0	4	14	49	0	8	55
GDP	0	17	45	0	2	9	34	0	13	61
CDP	0	33	64	8	20	45	>80	4	35	73
UDP	0	41	71	2	7	24	60	0	11	60
ATP	0	6	34	0	0	4	24	0	4	33
ITP	0	9	39	0	0	2	11	0	2	17
GTP	0	5	25	0	0	0	7	0	2	24
CTP	0	11	41	0	2	5	29	0	4	37
UTP	0	14	49	0	0	2	17	0	2	20
d-AMP	11	52								
d-GMP	6	41								
d-CMP	18	65								
TMP	24	74								
d-ATP	0		35							
d-GTP	0		26							
d-CTP	0		43							
TTP	0		52							
DPN	64	80	>80	68 <sup>б</sup>	>80	>80		>80	>80	>80
DPNH	20	71						10	44 <sup>в</sup>	80
TPN	3	60		14	43	>80				
TPNH	0	34						9	51 <sup>б</sup>	>80
ADPG	22	77	>80	30	57	>80		1	34	73
GDPM	12	72	>80	7	18	51		13	60	>80
CDPG	27	>80	>80	45	67	>80		1	27 <sup>в</sup>	>80
UDPG	34	>80	>80	17	39 <sup>в</sup>	77		2	38 <sup>в</sup>	>80
UDPAG	44	>80	>80	32	55 <sup>в</sup>	>80		0	9	66
UDPGA	4	73			3					

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co

<sup>б</sup> Пятно на втором фронте элюирования.

<sup>в</sup> Вытянутое пятно.

оставались в начальном положении, что упрощало разделение и идентификацию оснований и нуклеозидов. В соответствии с методикой К Рандерат и Э. Рандерата [68] на другой пластинке элюировали раствором хлорида лития нуклеотиды: 2 мин 0,2 М раствором, 6 мин 1,0 М раствором и в заключение 1,6 М раствором при общей длине пути элюирования 13 см. Пластинку между элюированиями не сушили, иными словами, проводили

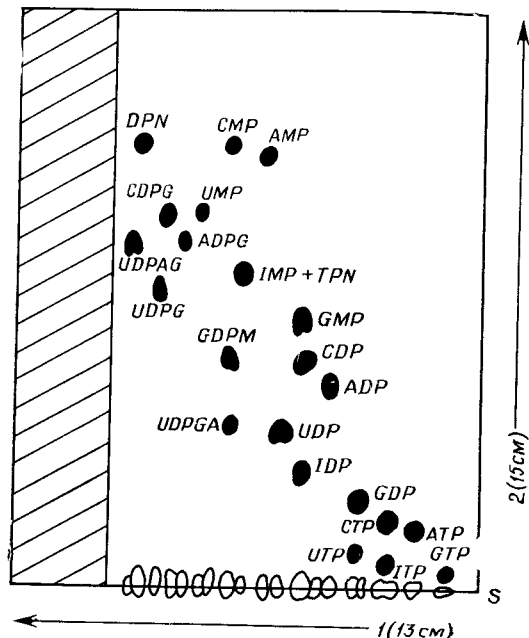


Рис 241. Двумерная анионообменная тонкослойная хроматограмма смеси мононуклеотидов [68] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co)

Толщина слоя РЕИ целлюлозы 0,5 мм Раствор (0,1 мл), содержащий 23 рибонуклеотида (по 10—15 мкмоль каждого) наносят из микропипетки на слой в точке S двумя порциями по 0,05 мл Перед нанесением второй порции пластину сушат Методика последующего элюирования и обнаружения описана в тексте После окончания элюирования в первом направлении с пластинки соскребают часть слоя (заштрихованная область)

градиентное элюирование. Далее пластинку сушили, промывали 15 мин в 1 л абсолютного метанола и проводили элюирование во втором направлении буферными растворами муравьиной кислоты и формиата натрия (рН 3,4); 30 с 0,5 М раствором, 2 мин 2,0 М раствором и наконец 4,0 М раствором на 15 см. Промывка метанолом и элюирование во втором направлении приводили к исчезновению всех нуклеиновых оснований и нуклеозидов, за исключением ксантозина.

Фуллerton и Финч [70] при проведении реакции обмена между пирофосфатом и аденозинтрифосфатом вводили мочевины

в состав элюирующих растворителей, с тем чтобы добиться хорошего отделения АТР от пирофосфата. В ходе двустадийного хроматографирования на РЕИ-целлюлозе пробы сначала элюировали 1 М раствором хлорида лития на расстояние 6 см, чтобы продвинуть ортофосфат перед АТР, а затем без промежуточной сушки 1,5 М раствором хлорида лития с добавкой 0,2 М раствора ацетата натрия и 4,0 М раствора мочевины.

Кэшель и др. [71], работая со смесями нуклеотидов, содержащими меченный  $^{32}\text{P}$  ортофосфат, установили, что при значительном содержании последних наблюдается образование больших хвостов. Избежать этого можно, применив раствор, элюирующий ортофосфаты, и одновременно уменьшив размеры пятен нуклеотидов.

Патаки и Нидервизер [72] разделили смеси нуклеотидов на отдельные компоненты градиентным элюированием на слоях РЕИ-целлюлозы. Индивидуальные соединения данной группы, а именно моно-, ди- и трифосфаты аденозина, уридина и цитидина, удалось разделить с помощью следующих растворов хлорида лития: 0,6 мл 0,1 М раствора, 0,6 мл 0,2 М раствора, 0,6 мл 0,5 М раствора, 0,6 мл 1 М раствора и 1,2 мл 2 М раствора; однако соответствующие соединения различных групп имели почти одни и те же величины  $R_f$ . Например, у дифосфатов аденина, гуанина, урацила, цитозина, инозина и тимина были приблизительно одинаковые  $R_f$ . Разделение проводили в камере сэндвичевого типа. Авторы работы [73] также пользовались методом градиентного элюирования.

Э. Рандерат и К. Рандерат [74, 75] анализировали на тонких слоях РЕИ-целлюлозы олигонуклеотиды после их химического или ферментативного дигерирования. Была предложена методика разрешения всех основных моно-, ди- и тринуклеотидов рибонуклеазы — продукта переваривания РНК ферментом поджелудочной железы. Фолькерт и Фирс [76] предложили очень чувствительный метод последовательного определения меченных  $^{32}\text{P}$  олигонуклеотидов хроматографированием на слоях РЕИ-целлюлозы. Олигонуклеотиды обрабатывали экзонуклеазой селезенки, и после разделения промежуточных веществ на слоях РЕИ-целлюлозы можно было определить, какой остаток был удален — Gp или Ap. Это определение проводили с помощью калибровочной сетки, исходя из различия в увеличении подвижности после удаления остатка. Чувствительность описанного метода в 10—20 раз больше, чем чувствительность электрофореза на бумаге со слоем DEAE-целлюлозы. Фолькерт и др. [77] опубликовали модифицированный метод распознавания на тонкослойных пластинках продуктов ферментативного дигерирования РНК, меченной  $^{32}\text{P}$ . В первом направлении проводился обычный электрофорез на ацетатцеллюлозе при рН 3,5, а после переноса на тонкий слой

методом Саузерна [78] осуществлялось хроматографирование смесью мочевины и частично гидролизованной РНК. Продукты дигерирования  $T_1$ -рибонуклеазы разделяли на слоях PEI-целлюлозы, а продукты панкреатического дигерирования рибонуклеазы на слоях DEAE-целлюлозы. Разрешение при этом было отличным, а чувствительность определения вследствие образования маленьких компактных пятен высокой. Литт и Хенкок [79] убедительно показали, что для определения последовательности нуклеотидов в областях однозначного хода превращений РНК полезным реагентом может быть кетоксаль ( $\beta$ -этоксид- $\alpha$ -кетомасляный альдегид). Эти авторы провели разделение хроматографированием на бумаге, однако нет причин, по которым нельзя было бы провести разделение методом ТСХ.

Установлено, что при разделении дезоксирибоолигонуклеотидов PEI-целлюлоза более эффективна, чем DEAE-целлюлоза [80].

Рандедат и Вайман [81] использовали ТСХ на PEI-целлюлозе для доказательства образования комплексов между дезоксирибоолигонуклеотидами и полирибонуклеотидами. Наносимые образцы первых соединений на пятна полиуридилевой кислоты, помещенной на тонкие слои PEI-целлюлозы, эти авторы добились, что олигонуклеотиды оставались в исходном положении в таких условиях, при которых обычно они перемещаются по слою.

Методика выполнения ферментативных реакций непосредственно на PEI-целлюлозе рассматривается в т. I, гл VI, разд. 6 [82].

#### Полифосфатцеллюлоза

К. Рандерат и Э. Рандерат [83] анализировали на этом катионообменном адсорбенте основания — урацил, цитозин, аденин, гуанин и соответствующие нуклеозиды.

#### 4. РАЗДЕЛЕНИЕ НА СЕФАДЕКСЕ

Стикланд [47] использовал для предварительного отделения нуклеозидов от веществ, мешающих их разделению, комбинированную пластинку, четверть которой покрыта слоем смеси дауэкса-1 и сефадекса G-25, а остальная часть только слоем сефадекса.

Виланд и Детерман [84] разделяли моно-, ди- и трифосфаты аденозина градиентным элюированием на формиатной модификации диэтиламиноэтилсефадекса. Начав элюирование с 60 мл 1 н. муравьиной кислоты, они постепенно меняли состав

растворителя, добавляя 2 М раствор формиата аммония в 50 мл 10 н. муравьиной кислоты. Пятна обнаруживали опрыскиванием раствором флуоресцеина и наблюдали их в УФ-свете. Хашизуме и Сазаки [85] разделили нуклеотиды на таком же субстрате, элюируя пробу 1 н. раствором муравьиной кислоты. При этом получены следующие величины  $R_f$ : 5'-цитидинмонофосфат 0,64; 3'-уридинмонофосфат 0,05; 5'-уридинмонофосфат 0,03; уридиндифосфат 0,02; 3'-аденозинмонофосфат 0,53; 5'-аденозинмонофосфат 0,58; аденозинтрифосфат 0,02; 3'-гуанозинмонофосфат 0,07; 5'-гуанозинмонофосфат 0,08 и 5'-инозинмонофосфат 0,03.

Тортолани и Колози [86] хроматографировали аденин, тимин, урацил, ксантин, гипоксантин, цитозин и их нуклеозиды на смесях мелкодисперсного сефадекса G-10 с силикагелем GF или с микрокристаллической целлюлозой при соотношении компонентов смеси 16 : 4. Слой элюировали методом восходящей хроматографии 0,05 М фосфатным буферным раствором (рН 7,0).

#### 5. РАЗДЕЛЕНИЕ НА СЛОЯХ ИОНООБМЕННИКОВ

Томаш [87—91] изучал возможность разделения нуклеотидов и их компонентов на слоях смолы типа дауэкс-50. С этой же целью были исследованы пластинки фиксина 50-X8 (Chippinot) или хроматографические листки ионекста 25SA (Machery and Nagel), адсорбционные слои которых состоят примерно на треть из смолы типа дауэкс-50 и на две трети из силикагеля. На пластинках фиксина 50-X8 ( $H^+$ ), элюируя пробу деионизованной водой, можно анализировать 5'-рибонуклеотиды, но не удается разделить изомерные нуклеотиды [87]. Восемь основных рибо- и дезоксирибонуклеозидов разделены на слоях смолы в  $NH_4^+$ -форме двумерным элюированием с применением ацетатных буферных растворов, рН 3,5 и 6,5 [88]. При непрерывном элюировании 2,8 н. соляной кислотой на слоях фиксина 50-X8 ( $H^+$ -форма) разделили 5-метилцитозин,  $N^6$ -метиладенин, аденин, гуанин, цитозин, 5-оксиметилцитозин, тимин и урацил [89].

#### 6. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Дозе и Ризи [92] использовали электрофорез высокого напряжения на слоях агара для разделения компонентов смеси нуклеиновых кислот с последующей спектроскопической идентификацией их. Вайнер и Зак [93] разделили методом электрофореза пурины и пиримидины рибонуклеиновой кислоты на тонких слоях геля агара, нанесенных на тефлоново-стеклянную бумагу (Fiberfilm T-20, A-60, Pallflex). Для денситометрических измерений применяли также тонкие слои агара на кварцевых

пластинках. Пробы оснований наносили на слой агарового геля полосками фильтровальной бумаги или хлопковыми нитками № 30, пропитанными буферным раствором оснований Электрофорез проводили при напряжении 250 В

Борковский и др. [94] разделяли основания ДНК, аденин, гуанин, цитидин и тимин методом электрофореза на слоях агарового геля, используя 0,1 М буферный раствор ацетата натрия и уксусной кислоты (рН 3,7). Электрофорез проводили в течение 45 мин при напряженности поля 5—7 В/см. Образец получали в результате 60-минутного гидролиза ДНК 72 %-ной хлорной кислотой, а после гидролиза выпаривали хлорную кислоту, освобождая основные соли. Цанев и др. [95] изучали влияние концентрации РНК, величины рН, температуры, состава буферного раствора и концентрации геля на фракционирование и подвижность РНК при электрофорезе на слоях геля. Для электрофоретического разделения АМР, АДР, АТР [96] и смесей аденина, аденозина, адениловой кислоты и ди- и трифосфатаденозинов [97] применяли также гель агарозы.

Нуклеотиды можно также разделить методом электрофореза на слоях полиакриламида [98]. Пикок и Дингмен [99] фракционировали образцы РНК, отобранные из различных тканей крыс, на 3,5 %-ном геле, приготовленном в буферном растворе с рН 8,3. Чтобы улучшить разделение, применяли двумерный электрофорез на геле полиакриламида. Икемура и Дальберг [100] использовали 10 %-ный гель в первом направлении и 20 %-ный во втором для разделения низкомолекулярных образцов рибонуклеиновой кислоты. Варричио и Эрнст [101] проводили разделение на 16 %-ном геле с 7 М раствором мочевины (рН 8,3) в первом направлении и на геле без мочевины во втором направлении при разделении *E. coli* и цитоплазматических т-рибонуклеиновых кислот печени крыс. Де Вахтер и Фирс [102] применили для первой ступени разделения 12 %-ный гель с рН 3,5, содержащий 6 М раствор мочевины, с целью разделения некоторых частичных гидролизатов очищенной РНК в соответствии с длиной цепи и содержанием оснований. Разделение во втором направлении проводили только по длине цепи при рН 8.

Ригетти и Дрисдейл [103] исследовали возможность разделения нуклеотидов методом изоэлектрической фокусировки на полиамиде. Катон и Гольдштейн [104] провели электрофоретическое разделение РНК на геле полиакриламида с линейным градиентом от 2,5 до 12 %. На одном и том же геле можно разделить с хорошим разрешением все РНК от 4S до 28S. Джеппезен [105] использовал линейные градиенты от 3,5 до 7,5 % и от 2,5 до 7,5 % для разделения фрагментов ДНК. Полученные полосы были более четкими, чем при обычном электрофорезе на слоях геля.

Для разделения нуклеотидов [106—108] применяли также тонкослойный электрофорез на целлюлозе (см. выше разд. 2 «Разделение на целлюлозе»).

Браунли и Сенджер [109] анализировали меченые олигонуклеотиды, в молекулярные цепи которых входит до 50 остатков, методом одномерного электрофореза на ацетилованной целлюлозе, после чего переносили полосы на адсорбционный слой и проводили разделение методом ТСХ на слоях со смешанной DEAE-целлюлозой.

## 7. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Для количественного определения нуклеотидов и их составных частей предложен ряд методов.

Проводя количественное разделение адениннуклеотидов методом ТСХ на DEAE-целлюлозе, Берниг и Райнике [110] обнаружили, что имеющиеся в DEAE-целлюлозе примеси поглощают в той же области спектра, что и нуклеотиды. Удалить эти примеси удалось промывкой соляной кислотой (см. т. 1, гл. III, разд. 4). Элюирующим растворителем служила 0,02—0,3 н. соляная кислота, а ее точная концентрация зависела от свойств данной партии хроматографических пластинок. Чтобы выявить оптимальную концентрацию кислоты, испытывали каждую партию пластинок. Разделенные нуклеотиды элюировали с пластины 1 М раствором хлорида натрия и измеряли коэффициент поглощения элюата при 260 нм относительно элюата, полученного с не использованной для хроматографирования DEAE-целлюлозы.

Чейндж и др. [111] разработали спектрофотометрический метод определения микроколичеств адениннуклеотида в крови.

Для количественного анализа оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов и нуклеотидов после разделения их методом ТСХ можно использовать отражательную спектроскопию *in situ* [28, 112—115]. Границы чувствительности при определении отражательным методом соответствуют 0,5—1,0 мкг на пятно [112], а средняя точность составляет 4,0—5,1 %, однако при введении внутреннего стандарта можно улучшить воспроизводимость до относительного стандартного отклонения 3—4 % [114].

Патаки и др. [116, 117] измеряли интенсивность флуоресценции *in situ* для количественной оценки содержания оснований нуклеиновых кислот, нуклеозидов и нуклеотидов. Гиссель и Штолль [118] применили этот же метод для рутинного определения инозина и гипоксантина в мышечных тканях трупов.

Наиболее чувствительны, конечно, те методы, в которых используются радиоактивные изотопы. К. Рандерат и Э. Рандерат

[119, 120] описали технику введения трития *in vitro* для количественного анализа производных рибозы на субнаномолярном уровне; чувствительность такого определения примерно в тысячу раз выше, чем у обычных методов. Содержание отдельных компонентов определяют при этом методом счета сцинтилляций. Рандерат и др. [121, 122] анализировали таким способом основания рибонуклеотидов. Чанг [123] модифицировал эту методику, с тем чтобы можно было обнаруживать те из оснований, содержание которых мало. Для анализа нуклеотидов и их компонентов можно использовать также радиоактивный фосфор [71, 124]. Джонсон и Осуджи [125] предложили также использовать меченую  $^{35}\text{S}$  *n*-гидразинбензолсульфокислоту в качестве реагента для приготовления производных нуклеозидов. Конечно, можно применять соединения, меченные  $^{14}\text{C}$  [126], но это не особенно желательно из-за низкого уровня активности изотопа.

## 8. ПРОЧИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выше уже был приведен ряд методов обессоливания нуклеотидов, рассмотрим еще несколько таких методов, которые в некоторых случаях могут оказаться полезными. Даугерти и Шепартц [127] рекомендовали использовать колонку, заполненную нерастворимым поли-*N*-винилпирролидином (порошок Поликар АТ, GAF), для обессоливания нуклеотидов, нуклеозидов, пуринов и пиримидинов. Эти соединения количественно элюируют из колонки дистиллированной водой, и притом в малых объемах. Нуклеотиды элюируются непосредственно перед хлоридом натрия, но их не удается отделить от сульфата аммония. Аденин, аденозин, урацил, гуанин и уридин элюируются после солей. Чтобы обессолить растворы олигонуклеотидов, ван ден Бос и др. [128] перемешивали олигонуклеотиды, содержащие соли (от 20 до 200 мкг), с 1—3 г DEAE-целлюлозы в 160—400 мл воды при комнатной температуре в течение часа. Затем фильтровали и промывали водой, чтобы удалить остатки солей и мочевины (если она была). Олигонуклеотиды извлекали с DEAE-целлюлозы, перемешивая с 10 мл 30 %-ного раствора триэтиламинкарбоната (рН 10) в течение 30 мин. Затем суспензию фильтровали и удаляли триэтиламинкарбонат при пониженном давлении и температуре 40°C. Выход олигонуклеотидов превышал 90 %. Карон и Дюгас [129] использовали для удаления солей предварительно промытую смолу дауэкс 1-X2 (СГ-). Раствор нуклеотида, подлежащий обессоливанью, встряхивали 30 мин с 10 мг смолы, фильтровали, промывали смолу водой, чтобы удалить соляной раствор. Затем переводили анионообменный реагент в формиатную форму, встряхивая

и дважды прополаскивая смолу 1,0 М раствором формиата аммония порциями по 75 мл в течение 20 мин. После этого смолу промывали еще раз и извлекали из нее обессоленные нуклеотиды, встряхивая с 25 мл 10 М раствора муравьиной кислоты. Кислоту удаляли лиофилизацией. Выход продуктов составлял 92—98 %. Нил и Флорини [130] разработали метод обессоливания малых объемов раствора посредством двойного центрифугирования. Можно быстро обессолить от 0,5 до 5,0 мл раствора, пропуская его при центрифугировании через слой шариков сефадекса G-25 (предварительно сефадексы выдерживают до набухания в 0,1 М растворе сульфата аммония), помещенный в полиалломерный центрифужный стаканчик емкостью 40 мл. В дне этого стаканчика предварительно просверливают три отверстия и помещают его в другой центрифужный стаканчик емкостью 50 мл. При объемном соотношении проба/слой сефадекса 0,17—0,27 получены хорошие выходы.

Дерр и др. [131] показали, что аминопурины и аминопиримидины взаимодействуют с флуоресцирующими тонкослойными пластинами. По-видимому, активированный марганцем силикат цинка реагирует с соляной кислотой, образуя нефлуоресцирующее соединение, которое уменьшает подвижность пуриновых оснований и может разрушить их. Поэтому наносить такие образцы на слой адсорбента авторы [131] рекомендуют в виде раствора в 0,05 н. или даже более разбавленной соляной кислоте в зависимости от того, сколько раз проводится нанесение.

Муни и др. [132] хроматографировали на силикагеле триметилсилилированные пурины и пиримидины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pataki G., "Thin-Layer Chromatography of Nuclear Acid Bases, Nucleosides, Nucleotides and Related Compounds", in "Advances in Chromatography", Vol. 7, J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1968, p. 47.
2. Randerath K., Randerath E., "Thin-Layer Separation Methods for Nuclear Acid Derivatives", in "Methods in Enzymology", Vol. XII, A. L. Grossman, K. Moldave, Eds., Academic Press, New York, 1967, p. 323.
3. Scheit K. H., "Layer-Chromatogr. of Oligonucleotides", in "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. 1, A. Niederwieser, G. Pataki, Eds., Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1970, p. 197.
4. Saukkonen J. J., Chromatogr. Rev., 6, 63 (1964).
5. Randerath K., Angew. Chem., 73, 674 (1961).
6. Randerath K., Angew. Chem., 73, 436 (1961).
7. Scheig R. L., Annunziata R., Pesch L. A., Anal. Biochem., 5, 291 (1963).
8. Cerri O., Maffi G., Boll. Chim. Farm., 100, 951 (1961).
9. Massaglia A., Rosa U., Sosi S., J. Chromatogr., 17, 316 (1965).
10. Tomaszefski J. F. Jr., Barrios R. J., Sudilowsky O., Anal. Biochem., 60, 589 (1974).

10. Smrt J., Collect. Czech. Chem. Commun., 40, 1043 (1975).
11. Scheit K.-H., Biochim. Biophys. Acta, 134, 218 (1967).
12. Nowoswiat E. F., Poonian M. S., J. Chromatogr., 72, 217 (1972).
13. Verdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Guskova L. I., Levitan T. L., Sheichenko V. I., Budovsky E. I., Biochim. Biophys. Acta, 340, 153 (1974).
14. Neskow S., Miyazaki T., Khwaja T., Meyer R. B., Heidelberger C., J. Med. Chem., 16, 524 (1973); CAMAG Bibliogr. Serv., 31, 21 (1973).
15. Cadet J., Téoule R., J. Chromatogr., 76, 407 (1973).
16. Wimmer E., Reichmann M. E., Nature, 221, 1122 (1969).
17. Michniewicz J. J., Bahl C. P., Itakura K., Katagiri N., Narang S. A., J. Chromatogr., 85, 159 (1973).
18. Munns T. W., Sims H. F., J. Chromatogr., 111, 403 (1975).
19. Upton J. D., J. Chromatogr., 52, 171 (1970).
20. Hynie S., J. Chromatogr., 76, 270 (1973).
21. Hawrylyshyn M., Senkowski B. Z., Wollish E. G., Microchem. J., 8, 15 (1964).
22. Randerath K., Struck H., J. Chromatogr., 6, 365 (1961).
23. Di Jeso F., J. Chromatogr., 32, 269 (1968).
24. Randerath K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 452 (1962).
25. Randerath K., Nature, 205, 908 (1965).
26. Randerath K., Randerath E., J. Chromatogr., 82, 59 (1973).
27. Randerath K., Randerath E., Chia L. S. Y., Nowak B. J., Anal. Biochem., 59, 263 (1974).
28. Narang S. A., Michniewicz J. J., Anal. Biochem., 49, 379 (1972).
29. Bjoerk G. R., Stevensson I., Biochim. Biophys. Acta, 138, 430 (1967).
30. Jacobson M., Hedgcoth C., Anal. Biochem., 34, 459 (1970).
31. Harada F., Kimura F., Nishimura S., Biochim. Biophys. Acta, 195, 590 (1969).
32. Ciardi J. E., Anderson E. P., Anal. Biochem., 22, 398 (1968).
33. Holguin-Hueso J., Cardinaud R., J. Chromatogr., 66, 388 (1972).
34. Mahapatra G. N., Friedmann O. M., J. Chromatogr., 11, 265 (1963).
35. Keck K., Hugen U., Biochim. Biophys. Acta, 87, 685 (1964).
36. Bialeski R. L., Anal. Biochem., 12, 230 (1965).
37. Gassen H. G., J. Chromatogr., 39, 147 (1969).
38. Mundry K. W., Priess H., Biochim. Biophys. Acta, 269, 225 (1972).
39. Tyihák E., J. Chromatogr., 14, 125 (1964).
40. Wright M. E., Satchell D. G., J. Chromatogr., 55, 413 (1971).
41. Mayer R. T., Holman G. M., Bridges A. C., J. Chromatogr., 90, 390 (1974).
42. Randerath K., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1, 435 (1962).
43. Randerath K., Nature, 194, 768 (1962).
44. Dyer T. A., J. Chromatogr., 11, 414 (1963).
45. Coffey R. G., Newburgh R. W., J. Chromatogr., 11, 376 (1963).
46. Swanson P. D., J. Neurochem., 15, 1159 (1968).
47. Stickland R. G., Anal. Biochem., 10, 108 (1965).
48. Stickland R. G., J. Chromatogr., 23, D8 (1966).
49. Lapidot Y., Barzilay I., Salomon D., Anal. Biochem., 49, 301 (1972).
50. Jaroszewicz K., Degueldre-Guillaume M.-J., Liébecq C., J. Chromatogr., 24, 279 (1966).
51. Grippo P., Iaccarino M., Rossi M., Scarano E., Biochim. Biophys. Acta, 95, 1 (1965).
- 51a. Kirnos M. D., Vasilyev V. K., Vanyushin B. F., J. Chromatogr., 104, 113 (1975).
52. Randerath K., Nature, 194, 768 (1962).
53. Nayar M. N. S., Life Sci., 3, 1307 (1964).
54. Bauer R. D., Martin K. D., J. Chromatogr., 16, 519 (1964).
55. Пантелеева Н. С., Вестн. МГУ, Сер. биол., 19, 73 (1974).
56. Dietrich C. P., Dietrich S. M. C., Pontis H. G., J. Chromatogr., 15, 277 (1963).

57. Randerath K., Biochim. Biophys. Acta, 61, 852 (1962).
58. Randerath K., Experientia, 20, 406 (1964).
59. Foster J. M., Abbott H., Terry M. L., Anal. Biochem., 16, 149 (1966).
60. Santini G., Ulrich V., J. Chromatogr., 49, 560 (1970).
61. Koenigk E., J. Chromatogr., 37, 128 (1968).
- 61a. Nazar R. N., Lawford H. G., Wong T.-F., J. Anal. Biochem., 35, 305 (1970).
62. Randerath K., Biochim. Biophys. Acta, 76, 622 (1963).
63. Randerath K., Randerath E., J. Chromatogr., 16, 111 (1964).
64. Gonzales L. W., Geel S. E., Anal. Biochem., 63, 400 (1975).
65. Jacobsen D. W., Kirchner J., Anal. Biochem., 26, 474 (1968).
66. Buteau G. H. Jr., Simmons J. E., Anal. Biochem., 37, 461 (1970).
67. Randerath K., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1, 553 (1962).
68. Randerath E., Randerath K., J. Chromatogr., 16, 126 (1964).
69. Raen H. P., Kraus F. E., J. Chromatogr., 35, 531 (1968).
70. Fullerton P. D., Finch R. L., Anal. Biochem., 29, 544 (1969).
71. Cashel M., Lazzarini R. A., Kalbager B., J. Chromatogr., 40, 103 (1969).
72. Pataki G., Niederwieser A., J. Chromatogr., 29, 133 (1967).
73. Schettino O., La Rotonda M. I., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 44, 1989 (1968).
74. Randerath E., Randerath K., J. Chromatogr., 31, 485 (1967).
75. Randerath E., Randerath K., J. Chromatogr., 31, 500 (1967).
76. Volkaert G., Fiers W., Anal. Biochem., 62, 573 (1974).
77. Volkaert G., Min Jon W., Fiers W., Anal. Biochem., 72, 433 (1976).
78. Southern E. M., Anal. Biochem., 62, 317 (1974).
79. Litt M., Hancock V., Biochemistry, 6, 1848 (1967).
80. Weimann G., Randerath K., Experientia, 19, 49 (1963).
81. Randerath K., Weimann G., Biochim. Biophys. Acta, 76, 129 (1963).
82. Randerath K., Randerath E., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 3, 442 (1964).
83. Randerath E., Randerath K., J. Chromatogr., 10, 509 (1963).
84. Wieland T., Determann H., Experientia, 18, 431 (1962).
85. Hashizume T., Sasaki Y., Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 27, 881 (1963); Chem. Abstr., 60, 12347 (1964).
86. Tortolani G., Colosi M. E., J. Chromatogr., 70, 182 (1972).
87. Tomasz J., J. Chromatogr., 84, 208 (1973).
88. Tomasz J., J. Chromatogr., 101, 198 (1974).
89. Tomasz J., Anal. Biochem., 68, 226 (1975).
90. Tomasz J., Acta Biochim. Acad. Sci. Hung., 9, 87 (1974).
91. Tomasz J., Farkas T., J. Chromatogr., 107, 396 (1975).
92. Dose K., Risi S., Z. Anal. Chem., 205, 394 (1964).
93. Weiner L. M., Zak B., Clin. Chim. Acta, 9, 407 (1964).
94. Borkowski T., Woicierowski J., Kulesza S., Anal. Biochem., 27, 58 (1969).
95. Tsanev R., Staynov D., Kokileva L., Mladenova I., Anal. Biochem., 30, 66 (1969).
96. Zak B., Weiner L. M., Baginski E., J. Chromatogr., 20, 157 (1965).
97. Weiner L. M., Welsh B., Zak B., J. Chromatogr., 27, 512 (1967).
98. Wang K.-T., Wu Po.-H., J. Chromatogr., 38, 153 (1968).
99. Peacock A. C., Dingman C. W., Biochemistry, 6, 1818 (1967).
100. Ikemura T., Dahlberg J., J. Biol. Chem., 248, 5024 (1973).
101. Varricchio T., Ernst H. J., Anal. Biochem., 68, 485 (1975).
102. De Wachter R., Fiers W., Anal. Biochem., 49, 184 (1972).
103. Righetti P. G., Drusdale J. W., Ann. N. Y. Acad. Sci., 209, 163 (1973).
104. Caton J. E., Goldstein G., Anal. Biochem., 42, 14 (1971).
105. Jeppesen P. G. N., Anal. Biochem., 58, 195 (1974).
106. Fujimura R. K., Anal. Biochem., 36, 62 (1970).
107. Schweiger A., Guenther H., J. Chromatogr., 19, 201 (1965).
108. Monjardino J. P., Anal. Biochem., 28, 313 (1969).
109. Brownlee G. G., Sanger F., Europ. J. Biochem., 11, 395 (1969).
110. Boernig H., Reinicke C., Acta Biol. Med. Ger., 11, 600 (1963).

111. Chang C. M., Johnson S. A., Vercellotti J. R., Barboriak J. J., *Anal. Biochem.*, 23, 35 (1968).
112. Frei R. W., Zuercher H., Pataki G., *J. Chromatogr.*, 43, 551 (1969).
113. Koof H. P., Noronha R. V., *Z. Anal. Chem.*, 250, 124 (1970).
114. Frei R. W., Zuercher H., Pataki G., *J. Chromatogr.*, 45, 284 (1969).
115. Lieu V. T., Frodima M. M., Higashi L. S., Kunimoto L. H., *Anal. Biochem.*, 19, 454 (1967).
116. Pataki G., Stracky E., *Int. Symp. Chromatogr. Electrophoresis*, 4th, 1967, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 317.
117. Pataki G., Kunz A., *J. Chromatogr.*, 23, 465 (1966).
118. Gissel T. A. C., Stoll U., *Fleischwirtschaft*, 52, 771 (1972).
119. Randerath K., Randerath E., *Anal. Biochem.*, 28, 110 (1969).
120. Randerath K., Randerath E., *Experientia*, 24, 1192 (1968).
121. Randerath E., Yu C.-T., Randerath K., *Anal. Biochem.*, 48, 172 (1972).
122. Chia L.-L. S. Y., Randerath K., Randerath E., *Anal. Biochem.*, 55, 102 (1973).
123. Chang F. N., *Anal. Biochem.*, 63, 371 (1975).
124. Brownlee G. G., Sanger F., *Eur. J. Biochem.*, 11, 395 (1969).
125. Johnson M. W., Osuji G. O., *Anal. Biochem.*, 70, 45 (1976).
126. Debrececi N., Behme M. T., Ebisuzaki K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 115 (1970).
127. Dougherty T. M., Schepartz A. I., *J. Chromatogr.*, 40, 299 (1969).
128. Van den Bos R. C., De Regt V. C. H. F., Brand R. C., *Anal. Biochem.*, 41, 293 (1971).
129. Caron M., Dugas H., *J. Chromatogr.*, 101, 228 (1974).
130. Neal M. W., Florini J. R., *Anal. Biochem.*, 55, 328 (1973).
131. Derr R. F., Alexander C. S., Nagasawa H. T., *J. Chromatogr.*, 21, 146 (1966).
132. Muni I. A., Altschuler C. H., Neicheril J. C., *Anal. Biochem.*, 50, 354 (1972).

## Глава XXV

## ПЕСТИЦИДЫ

Обилие публикаций по применению ТСХ для разделения и обнаружения пестицидов не вызывает удивления, поскольку необходимы быстрые и чувствительные методы определения следов этих соединений в пищевых продуктах, а в некоторых случаях быстрые и чувствительные методы токсикологического анализа\*.

Прежде чем подвергать пестициды хроматографическому анализу, нужно их выделить из пищевых продуктов, почвы и т. д. Если происхождение образца известно, можно использовать метод экстракции, рекомендованный для данного пестицида или данной комбинации пестицидов. Однако недостаточно знать, каким пестицидом обрабатывали данное растение, поскольку в почве могли остаться другие пестициды, которыми ранее проводили обработку, и затем впитаться в растение. Подобно этому, животное, обработанное пестицидом определенного типа, могли ранее кормить люцерной или зерном, обработанными другим пестицидом. К числу растворителей, которыми экстрагируют пестициды, относятся ацетон, метанол, петролейный эфир, бензол, пропанол, хлороформ, метилхлорид, этилацетат, ацетонитрил и различные их комбинации. Шнорбус и Филлипс [1] показали, что эффективным растворителем для экстракции пестицидов также следует считать пропиленкарбонат. Недостаточно полная экстракция пестицидов из пробы может затруднить анализ их [2], особенно если приходится препарировать растительную или животную ткань [3]. Вероятно, здесь может быть полезна ультразвуковая обработка, хотя Хилл и Штоббе [4] не отметили преимуществ ее применения в отношении увеличения выхода при экстракции пестицидов из почв. Однако использование ультразвука позволяет ускорить экстрагирование.

Эффективность экстракции неоднократно проверяли, добавляя известные количества пестицида к растительной или животной ткани и проводя затем экстракцию и определение. Та-

\* Полезные методики определения пестицидов в почве и воде с применением ТСХ читатель может найти также в книге: Хроматографический анализ окружающей среды./Под ред. Р. Л. Гроба.— М.: Химия, 1979 — Прим. ред.

кая проверка не дает возможности оценить эффективность самой экстракционной методики, но позволяет определить величины потерь на других стадиях анализа.

Обычно перед ТСХ следует предварительно очистить экстракт данной пробы от примесей, поскольку в присутствии примесей снижается чувствительность, уменьшается разрешение и может наблюдаться образование прожилок и искажение формы пятен. Кроме того, примеси влияют на скорости элюирования пестицидов, которые могут поэтому отличаться от скоростей элюирования стандартных проб. Особенно нежелательно загрязнение образца жирами.

Один из обычно применяемых методов очистки микроколичеств пестицида (особенно при высоком содержании жира или воска в пробе) — распределение в системе двух несмешивающихся растворителей. Углеводородный растворитель, например гексан или петролейный эфир, и полярный растворитель, например метанол, ацетонитрил, ацетон или диметилсульфоксид, насыщенный этим углеводородным растворителем, при смещении расслаиваются на две фазы, причем соотношение фаз меняется в зависимости от типа пробы. При расслаивании фаз пестициды остаются в полярной фазе, а жиры и воски — в углеводородной. Пестициды затем переводят в свежий углеводородный растворитель, добавляя раствор хлорида натрия.

Разработан ряд методов очистки образцов, в частности а) пропускание через колонку с флоризилом PR [5]. Этот сорбент представляет собой синтетический силикат магния, прокаленный в течение 3 ч при 1250°C. Пробы пестицидов, растворенные в петролейном эфире, вводят в колонку и элюируют, увеличивая содержание диэтилового эфира в петролейном эфире. Бекман и Гарбер [6] очищали фосфорорганические пестициды последовательным элюированием бензолом, смесью диэтилового эфира с бензолом (1:2), ацетоном и метанолом. Кроме того, пестициды очищают от примесей следующими способами: б) на колонке с оксидом магния и целитом, в) на колонке с кислотным адсорбентом и целитом (для анализа хлордана и других хлорированных углеводородов); г) щелочным гидролизом, если пестициды устойчивы к щелочам; д) на колонке с углем (не все виды активного угля эффективны) [7, 7а]; е) совместной перегонкой несмешивающихся жидкостей [8]; ж) с помощью простых газохроматографических систем [9]; з) обработкой сефадексом LH-20 в ацетоне для удаления пигментов [10]; и) на колонке с силикагелем [11]; к) хроматографированием на клиновидных слоях [12], где толстая часть слоя используется для того, чтобы удерживать большие количества примесей (клиновидные формы, поставляемые фирмой Kontes), на рифленых пластинках, где толщина слоя,

расположенного над «канавкой» в восемь раз больше, чем на остальной части пластинки (рифленые пластинки Chromolay поставляются фирмой May and Baker); л) хроматографированием на многослойных пластинках: на двойном слое силикагель—оксид алюминия, где силикагель удерживает примеси, а пестициды разделяются при элюировании более полярным растворителем (после поворота пластинки на 90°) по слою оксида алюминия, или на слое целлюлоза—активный уголь и слое силикагеля, расположенном вдоль двойного слоя; на двойном слое отделяются примеси, а на силикагеле при одномерном элюировании происходит разделение пестицидов; м) вакуумной возгонкой [13]. Торнберг [14] рассмотрел методы приготовления и экстракции проб перед анализом, а Мак-Кинли и др. [15] исследовали методы очистки.

После очистки пробы необходимо повысить ее концентрацию. Упаривание до объема около 5 мл обычно проводят в испарителе Кудерны—Дениша, а дальнейшее концентрирование — в микроколонке Снайдера. Никогда не следует полностью высушивать пробу, потому что больше всего вещества теряется при испарении до малого объема или при полном высушивании [16].

Уокер и Бероза [17] изучили разделение 62 пестицидов в 19 различных растворителях; в табл. 25.1 приведены  $R_f$  для 10 исследованных растворителей, а именно хлороформа, смесей хлороформ—эфир (9:1), хлороформ—ацетон (9:1), хлороформ—уксусная кислота (9:1), бензол—этилацетат (9:1), бензол—ацетон (9:1), бензол—уксусная кислота (9:1), гексан—ацетон (8:2), гексан—метанол (9:1) и гексан—уксусная кислота (9:1).

Обнаружение пятен проводилось обработкой реактивом T-130, под действием которого реагирующие с бромом соединения дают желтые пятна на розовом фоне эозина. Далее хроматограмму обрабатывали реактивом T-231, при этом на слое обнаруживался еще ряд пятен. В заключение хроматограмму облучали 7 мин УФ-светом. После этой заключительной обработки обнаруживались остальные пятна, за исключением тех нескольких пятен, которые исчезали после облучения.

Сузуки и др. [18], применив двустадийное элюирование на слоях оксида алюминия, разделили около 100 пестицидов на шесть групп. В группу I входят хлорорганические соединения, в группу II — хлорорганические и фосфорсодержащие соединения, в группу III — фосфорорганические пестициды, в группы IV и V — карбаматные и триазиновые гербициды, в группу VI — феноксигербициды. Наилучшим для двустадийного разделения признано сочетание гексана для первой стадии и смеси гексан—бензол (7:3) для второй стадии. Пестициды



Величины  $R_7 \times 100$  пестицидов, полученные на силикагеле G с различными растворителями [17] а

Пестицид	Хлоро- форм	Хлоро- форм — эфир (9 : 1)	Хлоро- форм — ацетон (9 : 1)	Хлоро- форм — уксусная кислота (9 : 1)	Бензол — этил- ацетат (9 : 1)	Бензол — ацетон (9 : 1)	Бензол — уксусная кислота (9 : 1)	Гексан — ацетон (8 : 2)	Гексан — метанол (9 : 1)	Гексан — уксусная кислота (9 : 1)
Алдрин б	80	78	83	94	73	78	80	76	69	56
Арамит	62 б	68	79	62 84	59	71	56 б	52 г 56 б	40 б	28
Байер 25141 в	12	18	30	62	2	9 б 13 г	18	7	8	2
Бинапакрил (морозид) б	55	69	70	85	66	68	60	41	42	29
Каптан б	44	56	67	73	37	57	45	37	15	13
Карбофенотион (три- тион)	73	75	83	92	73	76	78	60	52	38
Хлордан б	79	76	83	93	73	78	78	X б	65	41
Хлортгон	0 б	0 б	0 б	0 б 85 б	0 14	0 28 б 67 б	23 б 61 б	0 15 б	7 б	2 б 22 б
Co-Ral	46	61	67	78	53	61	46	23	19	14
<i>n,n'</i> -DDE б	69	70	74	90	74	72	68	64	64	54
<i>o,p'</i> -DDT б	68	69	72	90	72	70	68	58	58	48
<i>p,p'</i> -DDT б	66	70	72	90	72	70	68	58	58	46
Делнав	0 б 64	0 б 72	0 83	4 б 66 78 б 86 г 90 б	0 58	0 <sup>2</sup> 73	0 б 44 б 53	0 43	6 б 18 б 33	0 26

IQ*	25 66 б	33 б 38 б	54 б 81 б 84 г	0 б 53 81	0 б 67 б 84	8 64	30 73	35 б 60	31 б 61 б	14 52 б	14 34
Деметон	26	33 г 37 б	54	68	8	31	34 б	31	16	13	13
Деметон, тиоловый изо- мер	8	13 б	24 б	49 б	0	6	X	7	5 б	0 б	0 б
Деметон, сульфон тиоло- вого изомера	0 б	X	5	23 б	0	0	X	0	7 б	0	0 11 б
Деметон, сульфоксид тиолового изомера	26	38	0 б 53 81	0 б 78 б 86 г 90 б	0 б 67 б 84	0 74	0 б 33 б	0 б 28 б 35 б	8 18 51	32	32
Диазинон	0 б	0 г	0 48 56	2 б 67 б	0 5 б 10 б	0 22 б 33 б	0 28 б 35 б	0 28 б	6 б 13 б	0 10 б	0 10 б
Дикаптон	66	72	77	84	62	70	65	38	24	45	45
Диэльдрин б	64	76	75	79	65	73	71	X	52	37	37
Диметоат	8	11 б	22	47	2	8	12	7	7	0	0
Кислородный аналог диметоата	X	0 б	5 б	17 б	0	0	X	0	6	0 б	0 б
Дисистон	63	80	80	83	69	76	72	61	54	41	41
Сульфон дисистона	29	49	60	64 б 68 г	22	45	40	23	8	5	5
Сульфоксид дисистона	9	13	25	59 83 б	0 69 б	6 75 б	19 б 71 б	5	7	3 40 б	3 40 б
Дилокс (диптерекс) б	3	4	10	39	0	3	17	4	7	4	4
Эндосульфан (тиодан) б	73	76	82	91	59 71	69 77	65 76	X X	32 58	26 40	26 40

Пестицид	Хлоро-форм	Хлоро-форм афир (9:1)	Хлоро-форм ацетон (9:1)	Хлоро-форм уксусная кислота (9:1)	Бензол-этил-ацетат (9:1)	Бензол-ацетон (9:1)	Бензол-уксусная кислота (9:1)	Гексан-ацетон (8:2)	Гексан-метанол (9:1)	Гексан-уксусная кислота (9:1)
Эндосульфан с низкой т. пл. <sup>б</sup>	72	75	82	91	69	76	75	X	56	40
Эндосульфан с высокой т. пл. <sup>б</sup>	59	64	76	85	57	67	64	X	32	27
Эндрин <sup>б</sup>	66	78	78	83	68	76	73	X	57	39
EPN	60	78	78	81	68	73	70	48	41	29
Эрадекс	66	71	79	90	63	73	64	59 <sup>г</sup> 63 <sup>б</sup>	38	35
Этион	66	80	80	85	71	77	74	57	50	37 44 <sup>б</sup>
Генит <sup>б</sup>	63	76	76	81	67	73	70	X	40	30
Гутион	33	55	63	65	33	54	45	27	13	7
Гептахлор <sup>б</sup>	76	80	79	86	75	78	80	X	65	57
Гептахлорэноксид <sup>б</sup>	68	78	78	84	69	74	75	X	56	41
Каратан <sup>б</sup>	66	78	79	85	73	76	75	58	49	X
Кельтан <sup>б</sup>	68	74	76	88	68	74	70	51	35	33
Кепон <sup>б</sup>	X	15	25	37	15	X	20	17	X	6
Линдан <sup>б</sup>	73	74	76	89	68	74	73	X	45	36
Малатион	40	63	72	77	46	63	44	35	25	22
Меназон <sup>е</sup>	0	0	0	35	0	0	8	0	4	0
Метоксхлор <sup>б</sup>	68	73	78	88	66	73	68	45	49	33
Метилпаратион	60	70	75	84	59	67	61	34	29	22

Мирекс <sup>б</sup>	81	77	82	92	75	79	81	X	70	62
Нейлед (дибром) <sup>б</sup>	33	45	58	66	0 18	0 36	39	25	5 12	0 11
Паратион	64	73	78	86	65	71	67	44	38 41 <sup>б</sup>	30
Форат	71	75	79	89	68	75	72	60	53	42
Фосдрин <sup>б</sup>	X	23	31 41	57 63	3	9 16	11 18	7 11	6	2
Фосфамидон <sup>б</sup>	4	9	17	48	0	5	7	4	4	0
Фостекс	74	77	81	91	71	77	76	57	4 52	42
Шрадан	0 <sup>б</sup>	0 <sup>б</sup>	4 <sup>б</sup>	X	0 <sup>б</sup>	0 <sup>б</sup>	X	X	4	X
Севин	20 <sup>б</sup>	36 <sup>б</sup>	51 <sup>б</sup>	65 <sup>б</sup>	19 <sup>б</sup>	34 <sup>б</sup>	35 <sup>б</sup>	20 <sup>б</sup>	6	6 <sup>б</sup>
Сульфотеп	56	68	72	85	64	66	57	42	44	32
Сульфенон <sup>б</sup>	X	64	71	80	X	X	51	X	X	18
TDE <sup>б</sup>	X	78	82	92	75	79	83	X	X	41
Тетрадифон (тедион) <sup>б</sup>	66	75	80	89	70	77	75	X	45	31
Токсафен <sup>б</sup>	76	76	83	93	74	78	81	X	59	40
VC-13	63	72	73	90	69	68	65	52	55	38
Зектран	28 <sup>б</sup>	43 <sup>б</sup>	60 <sup>б</sup>	12 <sup>б</sup>	23	44 <sup>б</sup>	2	38 <sup>б</sup>	10	0

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Assoc. of Agr. Chemists.

<sup>б</sup> Пятно становится видимым после УФ-облучения пластинки, опрысканной обнаруживающим реагентом.

<sup>в</sup> O, O-Дизтил-О-п-метилсульфинилфосфотриат.

<sup>г</sup> Пятно исчезает после УФ-облучения опрысканной пластинки (об обнаруживающих реагентах см. в тексте).

<sup>д</sup> X — видимое пятно отсутствует, очень слабое видимое пятно или образование прожилки.

<sup>е</sup> S-(4,6-Диамино-сим-м-триазин-2-ил)метил-O, O-диметилфосфотриат.

группы II и III—21 и 15 соединений соответственно — были подвергнуты многостадийному элюированию на колонке с силикагелем. Полученные элюаты разделяли на компоненты методом ТСХ и анализировали далее газохроматографически [19]. Применяя различные смеси растворителей для многостадийного элюирования, удалось разделить 100 пестицидов на пять групп; далее эти группы анализировали методом двумерной ТСХ и ГХ [20—21]. Тир и Бергнер [21а] использовали хроматографию на бумаге и ТСХ для разделения и идентификации важнейших пестицидов. Они разделили пестициды на три группы.

Сандрони и Шлитт [22] разработали методику обнаружения малых количеств хлор- и фосфорорганических пестицидов в овощах. Хлорорганические соединения эти авторы анализировали на слоях оксида алюминия DS-5 (SAMAG), пропитанных 0,4 %-ным водным раствором нитрата серебра. После нанесения пробы адсорбционный слой обрабатывали в течение часа 60,6 %-ной серной кислотой при относительной влажности 18 %, а затем проводили непрерывное элюирование циклогексаном в течение 90 мин. Пятна соединений обнаруживали, подвергая пластинки воздействию влаги и затем коротковолнового УФ-облучения. Фосфорорганические пестициды разделяли на слоях силикагеля G, помещенных в варио-КС-камеру\*, где в направлении от начального положения к краю хроматографической пластинки поддерживался градиент относительной влажности: 72, 64, 58, 47, 13, 3, 3, 3 и 3 %. Элюирующим растворителем служил метилхлорид, а для обнаружения пятен был использован метод, основанный на подавлении пестицидами биологической активности холинэстеразы. Таким методом были изучены 17 из наиболее часто применяемых пестицидов. Шехтер и Гетц [23] обсудили методы испытания и анализа остатков многокомпонентных пестицидов.

Этим вопросам посвящен ряд общих обзоров, в том числе обзоры Ковача [24], Эббота и Томпсона [25], Такешиты [26], Хилла [26а], Шермы и Цвейга [27], количественный анализ рассматривается в обзоре Макнейла и Фрея [27а].

### 1. ХЛОРОСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Холмер и Вуд [28] опубликовали методику устранения мешающих примесей из растительных экстрактов. После удаления примесей содержащиеся в экстрактах следы хлорорганиче-

\* Варио-КС-камера — камера для ТСХ, в которой газовая фаза насыщается парами жидкостей, помещенных в специальных лотках. Этим достигается программированное изменение состава подвижной жидкой фазы. Описание варио-КС-камеры, см. в статье: Geiss F., Schlitt H., Chromatographia, 1, 392 (1968). — Прим. перев.

ских пестицидов анализируют методом ТСХ или ГХ. Согласно методике, предложенной Холмсом и Вудом, к теплomu раствору 0,75 г нитрата серебра в 0,7 мл воды медленно добавляют 4 мл ацетона; всю массу перемешивают с 10 г оксида алюминия, содержащего 7 % влаги. После этого ацетон испаряют. Один грамм обработанного таким образом оксида алюминия вводят в виде густой суспензии в *n*-гексане в колонку размером 150×8 мм (вн. диаметр). После того как гексан вытечет из колонки и мениск достигнет поверхности оксида алюминия, в колонку вводят частично очищенную пробу, растворенную в 1,0 мл *n*-гексана. Эту пробу элюируют 11 мл гексана, при этом каротины остаются в колонке в виде красной, а серусодержащие соединения в виде черной полосы. Предварительную очистку пробы следует проводить посредством одного из упомянутых выше методов. Вуд [28а] рекомендует экстрагировать диметилсульфоксидом (ДМСО) хлорорганические пестициды из растительных эфиров. ДМСО растворяет меньше жира, и экстракт можно очистить, пропустив его сначала через колонку с дезактивированным флоризилом, который адсорбирует примеси, а затем элюируя пестициды гексаном.

Сузуки и др. [29] определили пределы чувствительности обнаружения 80 хлорорганических пестицидов при УФ-облучении до и после обработки реагентами, содержащими иод и о-толуидин. Пестициды делят на три группы в зависимости от величины предела чувствительности: от 1 до 3 мкг — первая группа, от 5 до 10 мкг — вторая группа и выше 25 мкг — третья группа.

Эббот и др. [30] описали метод выявления примесей хлорорганических пестицидов в жирах и овощах. После экстракции проб и концентрирования экстрактов последние очищают, пропуская через колонку с оксидом алюминия или экстрагируя ДМСО. Последующее разделение проводят на слоях силикагеля G, пропитанных 0,4 %-ным водным раствором нитрата серебра. Элюирующим растворителем служит гексан.

Петрович [31, 32] хроматографировал на слоях силикагеля G DDT, четыре изомера гексахлорциклогексана, алдрин, изодрин, диэльдрин, эндрин, хлордан и пентахлорфенол с различными растворителями. DDT и четыре гексахлорциклогексана (табл. 25.2) он элюировал петролевым эфиром (50—70°C). При элюировании циклогексаном удалось отделить алдрин ( $R_f$  0,58) от его стереоизомера изодрина ( $R_f$  0,48), а диэльдрин ( $R_f$  0,57) от его стереоизомера эндрина ( $R_f$  0,48). Пятна алдрина и его изомеров обнаруживали, опрыскивая пластинки 0,1 н. раствором перманганата калия. Пятна DDT и гексахлорциклогексанов обнаруживали следующим образом: пластинки опрыскивали моноэтанолмином и нагревали 20 мин

Таблица 25.2

Величины  $R_f \times 100$  некоторых хлорсодержащих углеводов, полученные на силикагеле с различными растворителями (длина пути элюирования 10 см<sup>1</sup>) [31, 32]<sup>a</sup>

Соединение	Хлороформ	Бензол — метанол (95 : 5)	Петролейный эфир (50—70° С)
DDT	91	93	44
α-Гексахлорциклогексан	92	96	28
β-Гексахлорциклогексан			<2
γ-Гексахлорциклогексан	90	94	19
δ-Гексахлорциклогексан	87	96	10

<sup>a</sup> С разрешения автора и Dr. Alfred Huethig Verlag.

при 100°С, после чего вновь опрыскивали смесью 1 н. раствор нитрата серебра — азотная кислота ( $d=1,40$ ) (10 : 1) и в заключение облучали УФ-светом или выдерживали на солнечном свету. Применив три растворителя разного состава, Петрович [33] сравнил также влияние степени подкисления силикагеля на разделение хлорсодержащих контактных инсектицидов (см. т. 1, гл. 3, табл. 3.5). Хотя диэльдрина нельзя отделить от алдрина, пользуясь хроматографической системой силикагель G — циклогексан, эти соединения легко разделить на оксиде алюминия G при элюировании гексаном или гептаном [34—36]; на силикагеле элюировать пробу следует гексаном или гептаном [35—37], а также смесями циклогексана с ацетоном [38] и циклогексана, жидкого парафина и диоксана [35].

Детерс [39] применил метод Петровича [32] для выделения и идентификации пентахлорфенола, используя подкисленные слои силикагеля, приготовленные с 0,05 н. щавелевой кислотой вместо воды. При элюировании хлороформом пентахлорфенол характеризуется  $R_f$  около 0,50. Измерив площадь пятна, можно провести полуколичественную оценку. Для более точного количественного определения пятна элюируют и измеряют поглощение элюата в ультрафиолетовой области спектра.

Ямамура и др. [40] исследовали разделение алдрина, диэльдрина и эндрина на слоях силикагеля с различными растворителями. Ямамура и Нивагучи [38] изучали разделение тех же соединений, а также тиодана на слоях кремневой кислоты, закрепленных крахмалом, с шестью различными растворителями. Наиболее эффективным растворителем оказалась смесь циклогексана с ацетоном (9 : 1), но при элюировании ею тех-

нических смесей у пятен образовались хвосты. Как выяснилось, в последнем случае лучше всего пользоваться смесью циклогексан—ацетон с соотношением компонентов 23 : 2.

Морли и Чиза [41], используя *n*-гексан в качестве элюирующего растворителя, разделили смесь пяти инсектицидов на силикагеле и получили следующие величины  $R_f$ : алдрин 0,69; *n,n'*-DDE 0,60, гептахлор 0,52; *o,n*-DDT 0,46 и *n,n'*-DDT 0,38. Эти результаты получены при исследовании экстракта пшеничного зерна, причем никакой предварительной очистки экстракта не проводилось. В то же время при использовании газовой хроматографии необходима некоторая предварительная очистка пробы. Можно сочетать ТСХ и ГХ, проводя сначала разделение на тонких слоях, элюируя разделенные соединения и идентифицируя их методом ГХ. Тэйлор и Фишуик [42] разделили хлорорганические пестициды на незакрепленных слоях на две группы перед газохроматографическим анализом.

Каваширо и Хосогои [37] исследовали группу реагентов, применяемых для обнаружения хлорсодержащих пестицидов, и считают наиболее удачным 0,5 %-ный спиртовой раствор *o*-толуидина или *o*-дианизина. После опрыскивания одним из них пластинку облучают коротковолновым УФ-светом, после такой обработки хлорсодержащие пестициды обнаруживаются в виде зеленых пятен на белом фоне. Чувствительность этих двух реагентов находится в пределах от 0,5 до 3 мкг в зависимости от природы обнаруживаемых соединений. Используя силикагель с *n*-гексаном в качестве растворителя, Каваширо и Хосогои получили следующие величины  $R_f$ : алдрин 0,58; хлордан 0,50; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота 0,0; DDT 0,45; диэльдрина 0,10; эндрин 0,10; гептахлор 0,55; линдан 0,15; пентахлорфенол 0,0 и тиодан 0,10. Стандартом при определении величин  $R_f$  служил антрацен.

Ковач [36] сравнивал эффективность определения следов хлорсодержащих пестицидов в пробах пищевых продуктов методами ГХ и ТСХ. В качестве тонких слоев он использовал оксид алюминия G, и силикагель (адсорбосил-1), элюирующим растворителем служил *n*-гептан, обнаруживающим реактивом — реактив Т-231. Чувствительность этого метода обнаружения очень высокая: 0,05 мкг пертана и ВНС, 0,1 мкг токсафена и хлордана и 0,01 мкг остальных соединений. Чтобы чувствительность была максимальной, пластинки до нанесения пробы следует промывать. С этой целью проводят двукратное элюирование дистиллированной водой: с нижнего края пластинки соскабливают полоску адсорбента шириной примерно 12,7 мм и с помощью фитильков из фильтровальной бумаги наносят воду на оставшийся слой. По окончании промывки пластинки сушат 30 мин при 75°С.

По сравнению с газовой хроматографией метод тонкослойной хроматографии имеет много преимуществ при определении следов пестицидов в пищевых продуктах, и «во многих случаях на тонкослойных пластинках удалось выявить соединения, которые не обнаруживались при газохроматографическом анализе, хотя в первом случае размер пробы был в 10 раз меньше» [36]. В более поздней своей работе Ковач [43] наносил пробы на слой оксида алюминия и непосредственно перед элюированием изооктаном погружал пластинки в 25 %-ный раствор N,N-диметилформамида в диэтиловом эфире. Перед опрыскиванием хромогенным реагентом пластинки сушили 10 мин при 50°C в печи с принудительной вентиляцией. Адамс и Шектер [44] применили для обнаружения систему нитрат серебра — 2-феноксэтанол, вводя нитрат серебра в слой силикагеля, а 2-феноксэтанол — в элюирующий растворитель.

Томас и др. [45], используя три предложенных Ковачем растворителя, определяли относительные величины  $R_f$  (табл. 25.3) 44 хлорсодержащих пестицидов.

Эббот и др. [35] хроматографировали 16 хлорорганических пестицидов, применяя 15 различных комбинаций адсорбент—растворитель (табл. 25.4). Пользуясь составленной ими таблицей, можно выбрать оптимальную систему для разделения любой данной пары или большего числа соединений. В качестве обнаруживающего реагента эти авторы предпочитают 0,5 %-ный этанольный раствор нитрата серебра, после опрыскивания пластинки облучают 10 мин УФ-светом. Возможен и другой метод обнаружения — обработка реактивом Т-229; пестициды обнаруживаются в виде ярко-желтых пятен на синем фоне.

Беумлер и Рипштейн [34] разделили на оксиде алюминия смесь шести хлорсодержащих пестицидов, применив гексан в качестве элюирующего растворителя. Для обнаружения соединений они пользовались реактивом Т-94. Чувствительность такого способа обнаружения менее 5 мкг. Кац [46] проводил визуальное обнаружение соединений этого типа с помощью реактива Т-101. Однако при этом не удается обнаружить дихлордибензил и DDE, поэтому пятна, соответствующие этим соединениям, обнаруживают опрыскиванием 0,005 %-ным раствором иода в хлороформе.

Адамович [47] исследовал группу ароматических аминов в качестве предполагаемых реагентов для обнаружения хлорорганических пестицидов. Наиболее пригодны для этой цели диметиланилин, *n*-фенилендиамин, бензидин, *o*-толуидин, дифениламин и  $\alpha$ -нафтиламин (см. т. I, гл. VII).

Моутс [48] опрыскивал пластинки небольшим количеством пероксида водорода, с тем чтобы исключить мешающее

Таблица 25.3

Величины  $R_s$  хлорсодержащих пестицидов, полученные в различных хроматографических системах и отнесенные к *n,n'*-TDE (1,1-дихлор-2,2-бис(*n*-хлорфенил)этану) [45]<sup>a</sup>

Пестицид	Система I <sup>b</sup>	Система II <sup>b</sup>	Система III <sup>г</sup>
Гексахлорбензол	2,7	1,7	— д
Алдрин	2,1	1,4	4,3
<i>n,n'</i> -DDE	2,0	1,4	3,4
Гептахлор	2,0	1,4	3,7
Хлордан	2,0; 1,8; 1,4; 1,2 <sup>e</sup> , ж	1,4; 1,3; 1,2; 1,1 <sup>e</sup> , ж	3,7; 3,4; 2,9; 1,6 <sup>e</sup> , ж
<i>o,n'</i> -DDT	1,9	1,3	3,0
PCNB	1,8	1,4	3,7
Пертран-олефин	1,8	1,4	4,4
<i>n,n'</i> -TDE-олефин	1,8	1,4	3,2
TCNB	1,7	1,3	3,2
Телодрин	1,7	1,4	3,5
Токсафен	1,7; 1,2 ж	1,3; 1,2 ж	3,0; 2,3 ж
Стробан	1,7; 1,2 ж	1,3; 1,2 ж	3,0; 2,3 ж
<i>n,n'</i> -DDT	1,6	1,2	2,2
<i>o,n'</i> -TDE-олефин	1,6	1,3	2,9; 2,2
Хлорбензид	1,3 (серое)	1,2 (дымчато-серое)	2,0; 0,0
BHC	1,3; 1,1; 0,27; 0,10 <sup>e</sup>	1,1; 0,92; 0,72; 0,25 <sup>e</sup>	1,8; 1,3; 0,75; 0,30 <sup>e</sup>
$\alpha$ -BHC	1,3	1,1	— д
Пертан	1,3	1,2	2,5
Линдан	1,1	0,92	1,3
<i>o,n'</i> -TDE	1,1	0,95	1,1
<i>n,n'</i> -TDE	1,0	1,0	1,0
Эндосульфат	0,88; 0,07 <sup>e</sup>	0,92; 0,24 <sup>e</sup>	3,1; 0,0 <sup>e</sup>
Роннель	0,85	1,1	2,2
Гептахлорэпоксид	0,71	1,0	2,4
Эндрин	0,71	1,0	2,9
Диэльдрин	0,52	0,90	2,8

Продолжение табл. 25.4

Пестицид	Система I <sup>б</sup>	Система II <sup>в</sup>	Система III <sup>г</sup>
Карбофенотион	0,42 (желтое)	1,0 (дымчато- желтое)	1,9
Метоксихлор	0,33; 0,27	0,79	0,85
β-ВНС	0,27	0,72	— д
Овекс	0,18	0,76	0,61
Дихлон	0,16	0,72; 0,00 <sup>е</sup>	0,00
Дирен	0,15 (серое)	0,51	0,20
Тетрадифон	0,11	0,82	0,90
δ-ВНС	0,10	0,25	— д
Эндринкетон (Дельта- Кето 153)	0,09	0,23 (очень маленькое)	0,56
Кельтан	0,06	0,28	0,00
Сульфенон	0,00 (большое дымчатое)	0,31 (желтое)	0,00
Каптан	0,00 (серое с чет- кими краями)	0,09	0,25
Хлорбензилат	0,00 (светлое)	0,05	0,25
Монурон	0,00 (большое и темное)	0,00	0,00
Диурон	0,00	0,00 (темное)	0,00
Эндринальдегид	0,00 (очень маленькое)	0,00 (очень маленькое)	0,23; 0,00 <sup>е</sup>
Эндриновый спирт	0,00	0,00	0,14; 0,00 <sup>е</sup>

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.<sup>б</sup> Оксид алюминия G, просушенный на воздухе в течение 72 ч; растворитель — *n*-гептан; разделение в камере с насыщенной атмосферой.<sup>в</sup> Оксид алюминия G, просушенный на воздухе в течение 72 ч; растворитель — смесь ацетон—*n*-гептан (2:98) в камере с насыщенной атмосферой.<sup>г</sup> Нейтральный оксид алюминия, пропитанный 25 %-ным раствором ДМФ в эфире; растворитель — изоктан.<sup>д</sup> Не определялось.<sup>е</sup> Величина  $R_f$  наиболее интенсивного пятна дана жирным шрифтом.<sup>ж</sup> Наряду с крупными пятнами наблюдаются прожилки.Таблица 25.4  
Величины  $R_f \times 100$  хлороорганических пестицидов, полученные в различных хроматографических системах при длине пути элюирования 15 см [35] а, б

Пестицид	Силкагель и оксид алюминия (1:1)		Силкагель								Оксид алюминия				
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Кизель- тип	Л	М
Алдрин	88	98	73	58	69	67	70	79	64	62	67	70	98	82	95
α-ВНС		69		43	37	37		59	28	29	52		92	63	87
γ-ВНС		58		37	27	27		47	18	19	46		94	55	78
<i>n,n'</i> -DDE	87	98	87	74	62	61	68	73	57	56	65	65	98	78	95
<i>o,n'</i> -DDT	71	90	74	50	58	54	62	71	46	48	59	50	97	69	89
<i>n,n'</i> -DDT	72	91	78	52	54	49	60	69	39	40	57	42	98	73	95
<i>n,n'</i> -TDE без HCE	85	98	88	67	62	61	72	76	53	51	49	53	98	69	89
<i>n,n'</i> -Дихлорбензофенон				30	48	45	53	67	27	26	59	14	92	75	93
Дизьдрин	69	58	53	48	48	41	46	63	48	54	65	12	88	55	31
Эндосульфан А				52	52	47	63	61	35	31	58	17	94	64	65
Эндосульфан В				48	42	42	58	65	26	26	49	2	86	9	4
Эндрин	82	98	69	48	62	61	65	73	53	52	65	13	88	61	51
Гептахлор				28	27	27	30	45	10	13	39	17	88	57	49
Гептахлорэпоксид				67	33	33	45	59	26	28	52	25	88	78	95
Метоксихлор				46	46	46	45	59	26	28	52	25	88	57	49
<i>n,n'</i> -TDE	66	77	58	67	46	46	45	59	26	28	52	25	92	57	71

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.<sup>б</sup> Растворители: А — циклогексан с 20 % жидкого парафина; Б — циклогексан с 8 % силиконового масла; В — циклогексан с 10 % жидкого парафина; Г — циклогексан—бензол (1:1) с добавкой 10 % жидкого парафина; Д — циклогексан с 20 % жидкого парафина и 10 % диоксана; Е — циклогексан с 20 % жидкого парафина и 5 % диоксана; Ж — циклогексан с 10 % жидкого парафина и 3,5 % диоксана; З — циклогексан с 5 % жидкого парафина и 2 % диоксана; И — петролейный эфир (40—60 °С) с 20 % жидкого парафина; К — петролейный эфир с 10 % жидкого парафина; Л — *n*-гексан; М — *n*-гексан.

влияние жиров при обнаружении хлорсодержащих пестицидов на слоях оксида алюминия, пропитанного нитратом серебра. Позднее он нашел [49], что введение окисленного растительного масла делает ненужным опрыскивание пероксидом водорода и что порог чувствительности обнаружения при этом снижается до 0,01 мкг. Адсорбционные слои, на которых проводилось разделение, Моутс готовил следующим способом. Промытый и еще влажный оксид алюминия G (30 г) смешивают с 0,2 г нитрата серебра, растворенного в нескольких каплях воды, 20 мл ацетона и 0,1 мл прогорклого растительного масла и полученную смесь перемешивают 10 с в смесителе. Сосуды, в которых готовят смесь, дважды ополаскивают ацетоном (10 мл×2); пластинки с нанесенным слоем сушат на воздухе.

Кадоум [11] предварительно промывал слои силикагеля и целлюлозы 1 %-ным раствором пероксида водорода в перегнанном ацетоне, а затем наново активировал, нагревая 60 мин при 120°C. Через 5 мин после окончания элюирования пластинку опрыскивали раствором флуоресцеина и облучали 5 мин УФ-светом. Эту обработку повторяли, после чего опрыскивали слои раствором нитрата серебра и вновь облучали УФ-светом. При такой обработке получают почти белый фон.

Шмит и др. [50] сообщили об использовании ТСХ как вспомогательного метода идентификации полученных при газохроматографическом анализе пиков пестицидов. Людвиг и Фреймут [51], определяя остатки инсектицидов в пищевых продуктах, смогли разделить DDT, ВНС и метоксичлор на тонких слоях супергеля; Эдер и др. [52] методами хроматографии на бумаге и ТСХ разделили и идентифицировали 21 инсектицид — хлорированные углеводороды и эфиры фосфорной кислоты. Следы этих инсектицидов были выделены из фруктов и бобовых. Нивагучи [53] определял ВНС спектрофотометрически, переводя его в 1,2,4-трихлорбензол после выделения с помощью ТСХ. Это превращение проводили за 30 мин при нагревании с большим избытком спиртового раствора гидроксида калия.

Церезиа [54] разделял смеси пестицидов методами двумерной ТСХ и хроматографии на бумаге. Наилучшая комбинация растворителей — это смесь пиридин — 95 %-ный этанол (4:1) для первого направления элюирования и смесь ацетон — вода (7:3) для второго направления. При элюировании указанными растворителями разделены следующие пары пестицидов: токсафен — линдан, пертан — метоксичлор и ротан — хлордан. При анализе трудных проб, которые не были в достаточной степени очищены от примесей, Каватский и Фраш [55] сначала проводили элюирование *n*-гептаном на слоях оксида алюминия, а затем поворачивали пластинку на 90° и элюировали пробу аце-

тонитрилом, насыщенным *n*-гептаном. Таким образом можно анализировать экстракты животных жиров. Элиаксис и др. [56] разработали методику быстрой идентификации остаточных следов хлорорганических пестицидов в крови и тканях двумерным хроматографированием на силикагеле G; элюентами при этом служат *n*-гексан в одном направлении и циклогексан — в другом. Шоколаи и Мадарич [57] проводили многостадийное элюирование при одномерном хроматографировании 13 хлорсодержащих пестицидов с 0,3 %-ным раствором этанола в гептане.

Недавно установлено, что в пробах хлорсодержащих пестицидов могут присутствовать полихлорбифенилы (PCB) и что результаты анализа таких проб могут быть ошибочными. Рейнольдс [58] использовал для отделения PCB от пестицидов флоризил, однако Бевеню и Огата [59] обнаружили, что флоризил необходимо предварительно испытывать, поскольку не все его партии оказались удовлетворительными. Ферингер и Вестфаль [60] разделили аналоги DDT в присутствии PCB двумерным хроматографированием. Хаттула [61] провел многостадийное разделение жиров, PCB и хлорсодержащих пестицидов, содержащихся в тканях рыб. Пробу в виде раствора в гексане наносили на слой и элюировали хлороформом на 8,5 см. После этого пластинку сушили и проводили элюирование до ее самого верха (20 см) гептаном. Буш и Ло [62] разработали метод количественного анализа PCB в присутствии пестицидов, а Фишбейн [63] опубликовал обзор, специально посвященный хроматографическим и биологическим проблемам, связанным с PCB.

Для количественного анализа смесей хлорсодержащих пестицидов применяют следующие методы: элюирование этих соединений и последующий их газохроматографический анализ [64, 65], спектрофотометрический анализ [66], флуоресцентный анализ (флуоресценция вызывается рентгеновским излучением) [67, 68], потенциометрическое титрование [69, 70], непосредственная денситометрическая оценка [71], измерение площади пятен [72, 73] и полярография [74].

Фишбейн [75] опубликовал также обзор хроматографических и биологических данных, относящихся к DDT и продуктам его метаболизма.

## 2. ФОСФОРСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Проводя токсикологическое исследование с целью обнаружения фосфорсодержащих инсектицидов в биологических материалах, Фишер и Клингельхеллер [76, 77] подвергали образцы щелочному гидролизу и лишь потом проводили экстракцию.

Поскольку в результате гидролиза инсектицида образуется несколько продуктов, т. е. каждое индивидуальное исходное соединение характеризуется серией величин  $R_f$ , то идентификация этого исходного соединения облегчается. Такая методика помогает идентифицировать пестициды, находящиеся в смеси с природными серусодержащими соединениями. Серусодержащие соединения обнаруживают 3 %-ным раствором азидата натрия (6—8 %-ный раствор азидата натрия более чувствителен) в 0,1 н. растворе иода; при этом на коричневом фоне пластинки появляются белые пятна. Систокс, метасистокс и тиометон образуют летучие тиоэферы, которые теряются в процессе гидролиза, но их можно обнаружить, если внести в паровую фазу полоску фильтровальной бумаги, смоченной иодо-азидным раствором. В тех случаях, когда при гидролизе образуются нитрофенолы, их можно обнаружить на хроматографической пластинке, если подвергнуть ее действию паров аммиака, которые усиливают желтую окраску нитрофенолов. Метилумбеллиферон, образующийся при гидролизе потазана, и бензацимид, полученный при гидролизе гузатиона, обнаруживаются по ярко-синей флуоресценции при УФ-облучении, а диазин, получаемый при гидролизе диазиона, можно обнаружить с помощью реагента Драгендорфа. Беумлер и Рипштейн [34] разделили смесь фосфорсодержащих пестицидов, используя в качестве растворителя смесь гексана и ацетона (4:1), а в качестве адсорбента силикагель. В качестве обнаруживающего реагента они применяли слабокислый 0,5 %-ный раствор хлорида палладия.

Величины  $R_f \times 100$  ряда фосфорорганических пестицидов приведены в табл. 25.5.

Паратион, метасистокс и малатион разделены на силикагеле G при элюировании толуолом [83]. Адсорбционные слои для такого разделения готовили следующим образом: смешивали 30 г силикагеля с 60 мл раствора флуоресцеина (20 мг флуоресцеина в 1,2 мл 0,1 н. раствора гидроксида калия с последующим разбавлением до 60 мл). Пластинки сушили 30 мин при 105°C. Пятна разделенных соединений обнаруживали, выдерживая пластинки в парах брома. При этом были получены следующие величины  $R_{st}$  (определены относительно паратиона): паратион или метилпаратион 1,00; метасистокс 0,80 и малатион 0,13. Пятна элюировали с пластинок и проверяли активность растворов на мухах *D. melanogaster*.

Хензи и Тирион [84] определяли следы малатиона в табаке и табачном дыме. Кадоум [85] выделил методом двумерной хроматографии из зерновых малатион и некоторые продукты его превращения. Для обнаружения пестицидов эти авторы использовали реактив Т-79.

Таблица 25.5  
Величины  $R_f \times 100$  некоторых фосфорорганических пестицидов<sup>а</sup>

Пестицид	Силикагель G			Полиамид		Кислый $Al_2O_3$ <sup>б</sup>		Флоризил <sup>б</sup>	
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	Е	Ж
Азинфос-этил	33	90		66	16	60	18	69	12
Азинфос-метил	19	88	66	54	26	48	15	60	9
Бромфос	85	93	95						
Карбофентион	83	96				98		93	90
Хлорфенвинфос	24	79							
Кумафос	33	90	81	66	6	86	25	71	12
Круфомат	6	43							
Дельнав				79	3	82	35	81	30
Деметон-S	33	93							
Метилдеметон-S	17	73							
Диазинон	61	95		87	35	79	33	88	47
Дибром	0—22 <sup>в</sup>	0—89 <sup>в</sup>	70	66	49		0	0	0
Дихлорфентион	77	96							
Дихлорвос	22—27	73	56						0
Димефокс	8	44							
Диметоат	5	37	35	26	74	18	0	30	3
Дисульфотон	82	97	100	88	12	11	78	88	85
Дикаптон						94	73	83	45
Этион	77	97	100	86	4	94	63	85	72
Этоат-метил	7	61							
Фенхлорфос	84	93							
Галоксон	4	71							
Малатион	37	95	82			71	26	75	24
Мекарбам	42	95							
Меназон	0	2							
Метасистокс-R	0	5	33	15	95	4	0	3	0
Мевинфос	10	64	34	57/65	90	24	0	38	0
Морфотион	6	49							
Паратион	57	91	86	77	9	93	90	86	48
Фенкаптон	74	97							
Форат	80	97	100	88	12	97	66	88	86



Продолжение табл. 25.5

Пестицид	Силикагель G			Полиамид		Кислый $Al_2O_3$ <sup>6</sup>		Флоризил	
	A	B	B	Г	Д	Е	Ж	Е	Ж
Фозалон	39	97							
Фосфамидон	4	34				16	0	22	0
Пиримитат	62	96							
Роннель			100	83	4	90	72	92	77
Рюлен				53	35	21	0	30	0
Шрадан	0	2							
Сульфотеп	75	92							
Тепп	0	0—50 <sup>b</sup>		7/71	94				
Тионазин	45	92				79	67	78	27
Трихлорфон	3	18	8	11	80	0	0	17	0
Тритион				80	3	98		93	90
Тиометон				82	19				
Вамидотион	1	16							
Зитрон						89	36	91	68

<sup>a</sup> Смеси растворителей: А — гексан—ацетон (5:1), Б — хлороформ—ацетон (9:1) [78]; В — бензол—ацетон (9:1) [79, 80]; Г — гексан—ацетон (4:1); Д — метанол—вода (1:1) [81]; Е — циклогексан—ацетон—хлороформ (70:25:5); Ж — 2,2,4-триметилпентан—ацетон—хлороформ (70:25:5) [82]

<sup>6</sup> Без связующего.

<sup>b</sup> Наблюдается образование прожилок.

Гельдмахер-Маллинкродт [86, 87] определял систокс и метасистокс после предварительного гидролиза пробы. Исследуемые соединения кипятили с этилатом или метилатом натрия в колбе с обратным холодильником. Величины  $R_f$  полученных соединений после разделения на силикагеле G со смесью толуол—петролейный эфир (2:1) приведены в табл. 25.6, где указана также окраска пятен после их обнаружения опрыскиванием медным или кобальтовым реагентом. Медный реагент — раствор 2 г хлорида меди(I) в смеси 10 мл этанола и 2,5 мл концентрированной соляной кислоты, а кобальтовый реагент — раствор 2,5 г нитрата кобальта и 1,25 г тиоцианата аммония в 10 мл этанола.

Штаммбах и др. [88] исследовали неочищенную смесь, полученную при приготовлении фенкаптона. Кроме примесей, со-

Таблица 25.6

Величины  $R_f \times 100$  систокса и метасистокса и продуктов их восстановления, полученные на силикагеле G со смесью толуол—петролейный эфир (2:1), и цветные реакции пестицидов [87]<sup>a</sup>

Пестицид	$R_f \times 100$	Реакция с медным реагентом <sup>6</sup>	Реакция с кобальтовым реагентом <sup>6</sup>
Систокс	5	Коричневая	Бирюзовая
Метасистокс	5	„	„
2-Этилтиоэтанол	7	Зеленая	Зелено-коричневая
1-Метилтио-2-этилтиоэтан	40	„	„
1,2-Бис(этилтио)этан	40	Коричнево-фиолетовая	Коричневая
1-Этилтиоэтантол	45	Желто-зеленая	Синяя

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Springer-Verlag.

<sup>6</sup> Состав реагентов для опрыскивания см. в тексте.

державшихся в исходных продуктах, в этой смеси присутствовали продукты окисления тиоэфира и гидролиза тиофосфата. Для того чтобы разделение было эффективным, его вели на двух пластинках. При первом хроматографировании на силикагеле G с циклогексаном в качестве элюирующего растворителя были выделены следующие соединения (приводятся вместе с их значениями  $R_f$ ): бис-2,5-дихлорфенилтиометилловый эфир (0,35); бис-(2,5-дихлорфенилтио)метан (0,45); 2,5-дихлорфенилтиометилхлорид (0,56); 2,5-дихлортиофенол (0,65) и 2,2', 5,5'-тетрахлордифенилсульфид (0,76). Технический фенкаптон, у которого в этом растворителе  $R_f$  равно 0,17, хроматографировали еще раз смесью тетрахлорида углерода и бензола (95:5). При этом собственно фенкаптон ( $R_f$  0,73) отделяли от диэтилдитиофосфорной кислоты ( $R_f$  0,0), фенкаптонсульфона ( $R_f$  0,06), фенкаптонсульфоксида ( $R_f$  0,12), O,O,S-триэтилдитиофосфата ( $R_f$  0,52) и от примесей неустановленного состава с величиной  $R_f$ , равной 0,95. Пятна делались видимыми после обработки парами иода.

И. Ковач [89] выделили O,O-диметил-O-(3-метил-4-нитрофенил)тиофосфат и четыре других родственных соединения из технического продукта, проведя хроматографирование на слоях силикагеля со смесью петролейный эфир (60—80°C)—ацетон (98,6:1,4) таким образом, что первое основное соединение можно было идентифицировать полярнографически.

М. Ковач [90] разделил 19 инсектицидов — органических тиофосфатов на слоях оксида алюминия. Пластинки он предварительно промывал элюированием дистиллированной водой, для нанесения которой на слой использовал фитильки из фильтровальной бумаги, затем сушил 45 мин при 80°C. После нанесения пробы в виде раствора в этилацетате Ковач пропитывал пластинки 15 %- или 20 %-ным раствором диметилформамида в эфире и сразу же начинал элюирование метилциклогексаном. При длине пути элюирования 10 см на пластинках, пропитанных соответственно 15 %-ным и 20 %-ным раствором, получены следующие величины  $R_f$ : рогор 0,1 и 0,1; гутион 0,9 и 0,6; ими-дан 0,9 и 0,7; метилпаратион 0,17 и 0,11; Co-Ral 0,23 и 0,15; малатион 0,34 и 0,22; дальнав 0,37 и 0,24; паратион 0,41 и 0,27; систокс (тиол) 0,44 и 0,32; EPN 0,49 и 0,33; метилтретион 0,50 и 0,36; сульфотеп 0,69 и 0,55; третион 0,74 и 0,59; роннель 0,76 и 0,62; этион 0,77 и 0,63; систокс (тионо) 0,79 и 0,67; тимет 0,81 и 0,71; дисистон 0,82 и 0,72 и диазинон 0,86 и 0,78. Серусодержащие фосфаты обнаруживали высокочувствительным специфическим реагентом Т-251. Эббот и др. [91] разделили смесь 13 фосфорорганических пестицидов, используя 14 различных хроматографических систем, в том числе такие адсорбенты, как силикагель, смеси кизельгур—силикагель (1:1) и кизельгур—оксид алюминия (1:1). Слои смешанных адсорбентов оказались более эффективными, чем слои чистого силикагеля, например при отделении карбофенотиона от фенхлорфоса и паратиона от тиометона. Количественные определения авторы работы [91] проводили методом ИК-спектрофотометрирования элюатов, полученных после разделения проб на тонких слоях. Тинокс — тиофосфат типа систокса и его основной метаболит — соответствующий сульфоксид можно разделить методами хроматографии на бумаге и ТСХ [92]. Наилучшим растворителем была пятикомпонентная смесь: толуол—ацетонитрил—метанол изопропанол—вода (40:20:16:16:9). Продукт метаболизма можно обнаружить при чувствительности обнаружения  $10^{-6}$  г, пользуясь раствором иодоплатината калия или хлорида палладия(II) в соляной кислоте. Акерман и Шпрангер [93] хроматографировали смесь сложных эфиров тиофосфорной кислоты типа систокса с той же системой растворителей. Они составили таблицу величин  $R_f$ , а также таблицы цветных реакций с 7 обнаруживающими реагентами. Пятна трудно обнаруживаемых соединений (содержание менее 10 мкг) обрабатывали раствором перманганата калия или хлорида кобальта(III) в ацетоне [94].

Брюо и др. [95] разработали метод электрофореза на геле для определения и идентификации фосфорорганических пестицидов. Предложенный метод основывается на том факте, что

пробы эстераз, извлеченных из различных органов крупного рогатого скота, можно разделить на 5—7 зон посредством электрофореза на геле агара; причем, если к указанным экстрактам добавить предварительно фосфорорганические пестициды, одна или несколько зон исчезают. В работе [95] даны картины подавления зон 28 соединениями.

Для обнаружения фосфорорганических пестицидов применяется множество реагентов. Грант и др. [96] привели таблицу чувствительности обнаружения 12 фосфорорганических соединений при обработке хроматограмм 11 различными обнаруживающими реагентами, а Уоттс [97] опубликовал обзор реагентов, применяемых для обнаружения соединений этого типа. Наибольшей чувствительностью отличается проба по подавлению активности холинэстеразы (Т-113); с помощью этой пробы можно идентифицировать весьма малые количества пестицидов — вплоть до  $40 \cdot 10^{-9}$  г. Содержащиеся в образце примеси мало влияют на результаты анализа. Однако надо следить, чтобы хроматограммы не были перегружены; Кессиди и др. [98] нашли, что экстракты люцерны, которую не опрыскивали пестицидами, образовали зоны подавления, когда аликватные доли были слишком велики.

Эскью и др. [78] модифицировали методику гидролиза фосфорсодержащих пестицидов на тонкослойных пластинках, с тем чтобы ею можно было пользоваться при обнаружении зон молибдатом аммония (реактив Т-16). С помощью этой методики можно идентифицировать пестицид в количестве 1 мкг при концентрации его в водном растворе  $0,001 \cdot 10^{-4}$  %. В работах [99, 100] рассматривается возможность применения 4-(*n*-нитробензил)пиридина для идентификации фосфорорганических соединений (реактив Т-183).

Количественное определение содержания инсектицида пигон и его кислородного аналога см. в т. I, гл. XI, разд. 1.

Блинн [101] исследовал выделение, идентификацию и количественное определение остаточных следов пестицида тимет. Усвоенные опрысканными пестицидом растениями микроколичества соединения подвергаются метаболизму, в результате которого образуются кислородный аналог тимета и продукты окисления. Блинн показал, что для определения микроколичеств пестицида в виде сульфона—кислородного аналога — лучше всего окислить тимет и продукты его метаболизма *m*-хлорнадбензойной кислотой. После превращения можно отделить сульфон от других продуктов окисления не только тимета, но и этиона, гутиона, третиона и дисистона, которые могут мешать колориметрическому определению с помощью хроматоповой кислоты [102]. Разделение проводилось на слоях,

приготовленных из смеси 30 г силикагеля G и 30 г силикагеля HF со 120 мл буферного раствора с pH 6. Приготовленные пластинки сушили на воздухе и дважды промывали элюированием свежеперегранным ацетоном. Пробы элюировали сначала свежим 1,75 %-ным раствором метанола в хлороформе в камере с насыщенной атмосферой, а затем хлороформом. Обнаружение пятен проводили, опрыскивая пластинки раствором хлорида палладия (III); количественный анализ можно выполнить, элюируя пятно с пластинки и измеряя поглощение в сероуглероде при частоте  $1325 \text{ см}^{-1}$ , можно также провести реакцию с хромотроповой кислотой и воспользоваться колориметрическим методом.

Гарднер [103] с целью более надежной идентификации соединений применил метод двумерного хроматографирования: после первого элюирования он окислял пробу и проводил элюирование во втором направлении, чтобы разделить продукты окисления. Для обнаружения Гарднер использовал метод ингибирования фермента (T-113) и реакцию с 4-(*n*-нитробензил)пиридином (T-183).

Саламе [104] дал таблицу величин  $R_f$  10 фосфорорганических инсектицидов, полученных на силикагеле с 16 различными растворителями. Стэнли [105] также исследовал разделение 31 фосфорорганического пестицида на силикагеле G с 6 различными растворителями. Последняя работа выполнена на микрохроматографических пластинках, длина пути элюирования составляла всего 5 см.

### 3. КАРБАМАТЫ

Чиба и Морли [106] разработали метод быстрого определения карбарила, 1-нафтилметилкарбамата, и продукта его распада 1-нафтола. Разделение проводили на пластинках с силикагелем, пользуясь в качестве элюирующего растворителя смесью бензол—ацетон (19:1), и получили следующие величины  $R_f$ : карбарил 0,17 и 1-нафтол 0,33. Пятна соединений становились видимыми после опрыскивания сначала 1,5 н. метанольным раствором гидроксида натрия, а затем раствором фторбората *n*-нитробензолдиазония (10 мг вещества в 100 мл смеси диэтиловый эфир—метанол, 1:1). После опрыскивания этими реагентами 1-нафтол обнаруживается в виде пурпурного пятна, а карбарил — в виде ярко-синего пятна, которое позднее меняет окраску и приобретает тот же цвет, что и пятно нафтола. Эти соединения можно обнаружить в экстрактах яблок и салата в таких малых количествах, как  $0,02 \cdot 10^{-4} \%$ , причем экстракты не нужно предварительно очищать, но после предвари-

тельной очистки чувствительность обнаружения повышается до  $0,005 \cdot 10^{-4} \%$ .

Либман и Шуман [107] использовали слои силикагеля клиновидной формы для разделения и идентификации изопронил-N-(3-хлорфенил)карбамата и *m*-хлоранилина, выделенных из картофеля при экстрагировании дихлорметаном. Пятна обнаруживали реактивом на основе нитрата серебра.

Нагасава и др. [108] хроматографировали 22 карбамата на слоях полиамида. Для обнаружения пятен использовали бромфлуоресцеиновый реактив [2], реактив T-222 и 0,1 %-ный раствор пинакриптола желтого в 95 %-ном этаноле с последующим наблюдением пятен в проходящем УФ-свете. Финочиаро и Бенсон [109] хроматографировали 19 пестицидов—карбаматов и три близких им производных фенолмочевины — на оксиде алюминия G или на силикагеле G-HR. Эти авторы использовали 14 методов обнаружения; для всех соединений пригоден реактив T-274, содержащий ванилин и серную кислоту.

Некоторые карбаматы можно обнаружить по подавлению действия холинэстеразы (реактив T-113). Гейке [110, 111] указал, что при использовании эстеразы бычьей печени пределы чувствительности обнаружения составляют 3—400 нг, а Мендоза и Шилдс [112] установили, что чувствительность пробы с эстеразой свиной печени еще выше: от 0,1 до 100 нг. Эти же авторы нашли, что пары брома или УФ-облучение, как правило, ослабляют ингибирующее действие карбаматов, хотя в некоторых случаях наблюдается и обратный эффект, как, например, при воздействии паров брома на карбарил.

Мак-Нейл и Хикичи [113], измеряя интенсивность флуоресценции *in situ*, нашли на вишнях беномил [метил-1-(бутилкарбамоил)бензимидазол-2-илкарбамат], а Фрей и др. [114] тем же методом обнаружили нанограммовые количества севина, который они предварительно гидролизвали до нафтола. Другие карбаматы также можно гидролизовать, а затем обработать дансилхлоридом, чтобы получить флуоресцирующие производные.

### 4. ПИРЕТРИНЫ И ДРУГИЕ ИНСЕКТИЦИДЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Спикету [115] первому удалось разделить пиретрин I и пиретрин II. Он использовал слои силикагеля с добавкой 20 % алабастра в качестве связующего и 20 %-ный раствор этилацетата в *n*-гексане, а в качестве обнаруживающего реактива применил флуоресцеин-бромный реагент Кирхнера и др. [116]. Величины  $R_f$  этих соединений равны соответственно 0,42 и 0,21. Шталь [117] также разделял и хроматографировал пиретрины,

и в том числе изопиретрины на силикагеле. Он проводил двумерное разделение и пользовался предложенной Миллером и Кирхнером [118] методикой проведения реакций на тонких слоях. Согласно этой методике, смесь пиретринов элюируют на тонкослойной пластинке смесью гексан—этилацетат (3:1) и облучают пластинку УФ-светом или выдерживают на солнечном свете, с тем чтобы катализировать окисление этих соединений. После этого пластинку поворачивают на 90° и элюируют тем же растворителем во втором направлении, при этом разделяются продукты окисления. Длина пути элюирования в обоих направлениях составляет 8 см. Для визуального обнаружения этих соединений применяют ряд реагентов, включая три- и пентахлорид сурьмы и 2,4-динитрофенилгидразин. Пероксиды пиретринов можно также обнаруживать с помощью реакции с иодидом калия и крахмалом (реактив Т-207). Активность различных фракций определяют биологической пробой, используя или личинки *Aedes aegyptici* или *Drosophila melanogaster* в возрасте от 4 до 8 суток. Пероксиды и люмпиретрины не проявляют активности. Олив [119] подобрал реагент (Т-250) для специфического колориметрического обнаружения пиретринов и пиперонилбутоксидов, поскольку эти два соединения часто сопутствуют друг другу.

Нэш и др. [120] выделял методом ТСХ ротенон из технического продукта; Дой [121] анализировал препараты корня *Derris* на содержание ротенона, проводя хроматографирование на слоях оксида алюминия со смесью бензол—этанол—вода (4:2:1). В указанных условиях ротенон характеризуется  $R_f$ , равным 0,73. Количественное определение проводилось путем измерения поглощения при длине волны 294 нм. Креллер [122] выделял следы ротенона из пищевых продуктов, элюируя пробы смесью гептан—циклогексан—этилацетат—вода (120:20:80:0,3). Точность определения ротенона при содержании его 0,05·10<sup>-4</sup> % составляла ±10—15 %. Дельфель и Тэллент [123] разделяли ротенон и дегуэлин на слоях, пропитанных раствором нитрата серебра, и идентифицировали эти вещества прямым денситометрированием.

Авторы работы [124] разделяли содержащиеся в *Chrysanthemum cinerariaefolium* соединения, обладающие инсектицидной активностью. Для обнаружения этих соединений они применяли 1 %-ный раствор ванилина в концентрированной серной кислоте, так как этот реагент чувствительнее реагентов, предложенных Шталем [117]. Налбандов и др. [125] применили ТСХ на силикагеле G для выделения из *Nicandra physalodes* нового соединения с инсектицидными свойствами. Пятна этого соединения обнаруживали реагентом на основе фосфомолибденовой кислоты.

## 5. ПРОЧИЕ ПЕСТИЦИДЫ

Блинн и Гантер [126] разработали методику разделения на тонких слоях арамитов и акарицидов OW-9, который представляет собой смесь двух органических сульфитов, близких по составу к арамитам. После тщательного удаления мешающих разделения примесей экстракт можно хроматографировать на силикагеле, элюируя пробу 3,5 %-ным раствором этилацетата в бензоле. При этом получают следующие величины  $R_f$ : арамит 0,58 и компоненты OW-9 0,46 и 0,30. Разделенные соединения обнаруживают, опрыскивая пластинки 1 %-ным этанольным раствором гидроксида калия и прогревая пластинки 5 мин в печи при 150°C. В результате такой обработки соединения гидролизуются с образованием неорганического сульфида. Органические вещества удаляют с пластинки, промывая ее ацетоном, и затем испаряют ацетон, нагревая пластинку 5 мин при 150°C. Пятна сульфита калия обнаруживали опрыскиванием смесью вода—ацетон—буферный раствор Бекмана № 3581, pH 7 (51:45:4), и 1 мл насыщенного раствора оксалата малахитового зеленого в ацетоне. При этом на синем фоне появляются белые зоны. Другой возможный реагент для обнаружения — 1,3,5-тринитробензол, при обработке которым на бесцветном фоне пластинки появляются пятна от розового до красного цвета.

Вагнер и др. [127—129] исследовали варфарин — средство для уничтожения грызунов. После разделения на силикагеле смесью 1,2-этилендихлорид—ацетон (9:1) авторы работы измеряли спектральным методом концентрацию этого вещества в плазме крови [128]. Рамо и Бенуа [130] разделяли варфарин, кумахлор и ракумин на слоях силикагеля, предварительно обработанных 0,3 M раствором ацетата натрия. Элюентом служила смесь толуол—этилформиат—муравьиная кислота (5:4:1). Обнаружение пятен проводили следующим образом: опрыскивали пластинку 0,5-ным пероксидом водорода, сушили при 100°C и опрыскивали 2 %-ным раствором хлорида железа (III). После повторной сушки при 105°C на слое выступали коричневые пятна. Рассел [131] разделял на силикагеле смесью дихлорметан—уксусная кислота (9:1) средства для уничтожения грызунов на основе кумарина и индандиона и обнаруживал эти соединения с помощью реактива Т-84 или Т-249 (реактива Паули). Яницкий и др. [132] разделили и идентифицировали различные изомеры, входящие в состав норбормида. Перри [133] смог обнаружить на силикагеле G микроколичества (~0,1 мгк) монофторацетата натрия, элюируя пробу 4 %-ным этанольным раствором гидроксида аммония (объем/объем). Это соединение обнаружено с помощью реактива Т-231 и определено количественно по площади пятна.

## 6. СИНЕРГИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ К ИНСЕКТИЦИДАМ

В инсектицидные препараты на основе пиретрина и аллетрина обычно вводят синергические добавки, увеличивающие эффективность действия биологически активного вещества. Применяемые в качестве таких добавок пиперонилбутоксид, бикарполат и октахлордипропиловый эфир были разделены на силикагеле G смесью гексан—этилацетат (3:1) в камере с насыщенной атмосферой [117]. При длине пути элюирования 8 см величины  $R_f$  равны соответственно 0,35, 0,23, и 0,67. Бероза [134] разделил все 9 метилendioксибензильных синергических добавок, которые применяются в торговых продуктах. Пробы синергических добавок он наносил в виде 1 %-ных растворов в ацетоне на пластинки с силикагелем, которые предварительно сушил в течение получаса при 105—110°C. Берозе удалось определить  $R_f$  этих соединений в 14 различных растворителях, некоторые из полученных результатов приведены в табл. 25.7. Для обнаружения пятен он использовал два реактива: на основе хромотроповой и серной кислот (1 об. 10 %-ного раствора 1,8-диоксинафталин-3,6-дисульфоната натрия, т. е. натриевой соли хромотроповой кислоты, на 5 объемов серной кислоты) и фурфурола и серной кислоты (соотношение компонентов 1:50). Идентификацию разделяемых соединений автор проводил по характеристическим цветам пятен, образующихся под действием этих реагентов (табл. 25.7). Азаринин и сезамолин, которые во всех применявшихся растворителях имели практически одинаковые величины  $R_f$ , можно отличить друг от друга с помощью реактива фурфурол—серная кислота.

При опрыскивании этим реагентом сезамолин обнаруживается на холоду в виде ярко-красных пятен, в то время как азаринин на холоду не дает цветной реакции и только после нагревания обнаруживается в виде черного пятна. Сезамекс также дает ярко-красное пятно под действием того же реагента, но его легко отличить от сезамолина по величине  $R_f$ . Пиперонилциклонен и *n*-пропилизом дают по несколько пятен, поскольку это товарные препараты, а не индивидуальные соединения. Таннер [135] определял метилendioксипроизводные соединения спектрофотометрически после обработки хроматограммы обнаруживающим реагентом на основе хромотроповой и серной кислот.

Фишбейн и др. [136] исследовали методом ТСХ продукты метаболизма пиперонилбутоксидов и тропитала в моче и желчи крыс. Лихтенштейн и др. [137] выделили из укропа ряд синергических добавок к инсектицидам, элюируя экстракты укропа бензолом на слоях силикагеля. В числе этих добавок были миристицин, апиол, дилапиол и *d*-карвон. Фишбейн и др. [138]

Таблица 25.7

Величины  $R_f \times 100$ , полученные при хроматографировании на силикагеле 3,4-метилendioксибензильных синергических добавок [134] <sup>a</sup>

Синергическая добавка	Ацетон—бензол (25:97,5)	Пропанол—бензол (5:95)	Этилацетат—хлороформ (4:1)	Цвет после опрыскивания смесью хромотроповой и серной кислот
Сульфокс-циде	2	34	28	Пурпурный с синим ободком
Сезамекс	16	63	42	Оранжевый
Бикарполат	25	71	58	Пурпурный с синим ободком
Бутоксипиперонил	30	70	64	Пурпурный с красноватым ободком
Сезамин	36	76	60	Пурпурный с коричневым ободком
Сезамолин	52	80	71	Пурпурный с коричневым ободком
Азаринин	52	80	72	Пурпурный
Циклоненпиперонил	39	73	35	„
	47	79	72	Желтовато-зеленый
	58	85	80	Пурпурный
	70		86	Красновато-розовый
<i>n</i> -Пропилизом	0	1	0	Розовый
	36		81	Пурпурный
	52	82		Розовый
	58			Темно-пурпурный
	77			Розовый

<sup>a</sup> Величины  $R_f$ , полученные в других растворителях, см. в оригинальной статье.

<sup>b</sup> Окраска пятна после 30-минутного прогревания при 105—110°C.

хроматографировали также продукты превращения синергической добавки — октахлордипропилового эфира — в моче и желчи крыс.

Хроматографии синергических добавок посвящено два специальных обзора [139, 140].

## 7. ФУНГИЦИДЫ

В разд. 1 и 4 гл. XI, т. 1 уже были описаны разработанные Кирхнером и др. [141] методы разделения и идентификации бифенила, применяемого в качестве фунгицида для обработки цитрусовых. Сало и Маекинен [142] использовали смесь растворителя «Shell Sol A» и уксусной кислоты (24:1) в качестве растворителя, а силикагель G в качестве адсорбента для разделения применяемых для обработки цитрусовых бифенила, *о*-фенилфенола и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Полученные ими величины  $R_f$  равны соответственно 0,81, 0,34 и 0,10.

Поскольку разработаны определенные правила применения добавок, предохраняющих пищевые продукты от поражения грибами, необходимы методы идентификации таких добавок, и для этой цели с успехом можно использовать ТСХ. Генсхирт и Морянц [143] разделили метиловый и пропиловый эфиры *n*-оксибензойной кислоты на слоях силикагеля G, активированного в течение 2 ч при 160°C. Элюирующим раствором растворителем служила смесь пентана и ледяной уксусной кислоты (22:3), длина пути элюирования составляла от 12 до 14 см. Количественные определения авторы проводили спектрофотометрическим методом после элюирования разделенных соединений с силикагеля. Рангоне и Амброзио [144] разделили метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый и бензиловый эфиры *n*-оксибензойной кислоты методом хроматографии с обращенными фазами на силанизованном силикагеле. Наилучшие результаты получены со смесями боратного буферного раствора (pH 11) с тетрагидрофураном (95:5) или диоксаном (90:10). Количественные измерения проводили спектрофотометрически после повторного элюирования.

Сало [145] разделил *n*-оксибензойную кислоту и 13 ее эфиров на смеси ацетиловой на 10% целлюлозы и полиамида, взятых в соотношении 1:1, используя в качестве растворителя смесь растворителя «Shell Sol A» — уксусная кислота (1:1).

Копиус-Пеереboom и Бикс [146] разделили с помощью ряда хроматографических систем группу из 9 веществ, применяемых в качестве добавок для предохранения пищевых продуктов. Хроматографирование на слоях целлюлозы продолжалось 5—6 ч, но разделение бензойной и сорбиновой кислот было лишь немного лучше, чем при хроматографировании на бумаге. Однако на слоях смеси силикагеля G и кизельгура (1:1) при элюировании смесью *n*-гексан-уксусная кислота (96:4) в камере с насыщенной атмосферой разделение этих двух соединений шло гораздо лучше. Пытаясь найти специфические обнаруживающие реактивы, авторы работы исследовали 12 различных

реагентов. В качестве общего метода обнаружения, позволяющего выявить все соединения данной группы, применяется последовательное опрыскивание пластинок бромфеноловым синим и 0,5%-ным раствором перманганата калия с добавкой 1% карбоната натрия.

Ковелло и др. [147, 148] исследовали несколько другую смесь из девяти веществ, применяемых для предохранения пищевых продуктов от порчи. Они проводили разделение на слоях силикагеля, нанесенных на хромированные латунные пластинки. Опрыскивание пластинок не проводилось, а разделенные соединения удаляли со слоев силикагеля методом возгонки, разработанным Белером [149]. Величины  $R_f$  ряда таких соединений даны в табл. 25.8.

Таблица 25.8

Величины  $R_f \times 100$  соединений, предохраняющих пищевые продукты от порчи, полученные в различных хроматографических системах<sup>а</sup>

Анализируемое соединение	Силикагель G <sup>б</sup> [147, 148]			Целлюлоза MN 300 [146]	Силикагель G и кизельгур G (1:1). Длина пути элюирования 20 см <sup>в</sup> [146]	
	A	B	B	Г	Д	Е
Бензойная кислота	24	65	88	50	154	111
Сорбиновая кислота	23	77	74	58	128	91
Салициловая кислота	53	79	70	56	100	100
Дегидроуксусная кислота	27	81	68	9	60	88
<i>n</i> -Хлорбензойная кислота	24	100	100			
<i>n</i> -Оксибензойная кислота	12	75	74	9	7	41
Метил- <i>n</i> -оксибензоат	66	88	72	75	12	75
Пропил- <i>n</i> -оксибензоат	67	90	71	90	18	84
Этил- <i>n</i> -оксибензоат				86	16	79
Коричная кислота	43	72	61			
<i>о</i> -Фенилфенол				95	13	136

<sup>а</sup> Растворители: А — бутанол, насыщенный 2 н. раствором аммиака; В — изопропанол—этанол—конц. аммиак—вода (5:2:0,5:1); В — бензол—уксусная кислота—вода (4:9:2); Г — *n*-бутанол—35%-ный аммиак—вода (7:2:1); Д — гексан—уксусная кислота (24:1); Е — петролейный эфир—эфир—уксусная кислота (80:20:1).

<sup>б</sup> Длина пути элюирования в камере с насыщенной атмосферой 10 см.

<sup>в</sup> Величины  $R_{st} \times 100$ , отнесенные к салициловой кислоте.

Госселе [150] использовал смешанный слой, состоявший из силикагеля GF и целлюлозы MN 300 F<sub>254</sub> (15:7,5 по массе), для разделения смеси веществ, предохраняющих пищевые продукты от поражения грибами, причем в качестве растворителя был взят верхний слой смеси петролейный эфир (40—60°C) — тетрахлорид углерода—уксусная кислота—хлороформ—муравьиная кислота (25:20:1:10:4). Пластинки элюировали дважды, каждый раз на 15 см. Нагасава и др. [151] хроматографировали на слоях полиамида 8 таких веществ в 6 растворителях, применив для полного разделения двумерное элюирование. Чианг [152] сравнивал разделение на силикагеле, полиамиде и смеси полиамид—силикагель (10:52) с двумя системами растворителей.

Байяй и др. [153] разделял 1 алкилгаллатов, используемых для продления сроков хранения жирных пищевых продуктов. Разделение велось на слоях силикагеля, пропитанных 2 %-ными растворами цинхонина и стрихнина, и определялась способность к образованию комплексов с этими алкалоидами.

Известно много различных типов фунгицидов, предназначенных для защиты от поражения грибами фруктов, зерновых и овощных культур во время выращивания. Авторы книги не ставили перед собой задачу рассмотреть хроматографию всех типов этих соединений, и ниже будет приведено лишь несколько примеров.

Беномил, один из важных системных фунгицидов, и метилтиофанат, другой системный фунгицид, образуют в процессе метаболизма в растениях метиловый эфир бензимидазолкарбамино-вой кислоты (МВС). Фон Стрик [154] разделили эти соединения, а также тиофант и два других возможных метаболита фунгицидов методом двумерной ТСХ на силикагеле, используя для элюирования в первом направлении смесь бензол—метанол (9:1), а во втором — смесь этилацетат—хлороформ (6:4). Абдуллаев и др. [155] определяли беномил и МВС спектрометрически, а Шерма [156] — по гашению флуоресценции на тонкослойной хроматографической пластинке.

Бейкер и др. [157] разработали методику идентификации с помощью ТСХ восьми системных фунгицидов. Для обнаружения соединений применяли УФ-спектроскопию или реакцию с Т-208. Методом ТСХ обнаруживали тирам [158], полибутен [159], каптан и каптакс [160], хлоронеб [161], дитианон [162] и тиабендазол [163].

Тэттон и Уэгстаф [164] смогли выделить и идентифицировать многие ртутьорганические соединения, применяемые как фунгициды, переводя их в соответствующие дитиозонаты перед хроматографированием на силикагеле или оксиде алюминия. Гайке и Шуфан [165] смогли обнаружить фунгициды в коли-

честве от 50 нг до 1 мкг, используя уреазу в качестве обнаруживающего реагента; при опрыскивании сульфидом натрия или дитиозоном можно обнаружить фунгициды в количестве от 0,5 до 20 мкг. Фишбейн и Фоукес [166] и Чегледи-Янко [167] хроматографировали на слоях силикагеля этиленбис-(дитиокарбамат) цинка (цинеб) и этиленбис(дитиокарбамат) марганца (манеб), а также ряд продуктов разложения этих соединений.

Шерма [168] опубликовал обзор по всем видам хроматографического анализа фунгицидов.

## 8. ГЕРБИЦИДЫ

Бахе [169] разработал метод выделения и обнаружения амибена (3-амино-2,5-дихлорбензойной кислоты) в помидорах. Это соединение используют для защиты рассады помидоров. Пробы его получали экстракцией помидоров; экстракт затем омыляли, чтобы освободить амибен от связующего материала. Разделение проводили на слоях силикагеля со смесью бензола и уксусной кислоты (5:1) в качестве элюирующего растворителя. При элюировании этим растворителем на расстоянии 16 см амибен характеризуется  $R_f$  0,44. Положение пятен на пластинке определяли опрыскиванием сначала 1 %-ным раствором нитрита натрия в 1 н. соляной кислоте, а затем 0,2 %-ным раствором дигидрохлорида N-1-нафтилэтилендиамин в 2 н. соляной кислоте. Если использовать экстракт, соответствующий содержанию гербицида в 2 г помидоров, то метод чувствителен до  $0,1 \cdot 10^{-4}$  %.

Штаммбах и др. [170] хроматографировали триазиновые гербициды — атразин, атратон и прометрин — и определили величины  $R_f$  этих и родственных им соединений, входящих в состав товарных гербицидов. Хенкель и Эбинг [171] разделили смесь шести подобных триазинов методом двумерного элюирования на просушенном на воздухе силикагеле, применив в качестве элюирующего растворителя смесь хлороформ—диизопропиловый эфир (3:2). Позднее Хенкель [172] сообщил о разделении триазиновых гербицидов элюированием смесью хлороформ—тринитрометан (1:1 и 5:1). Маннер [173] определил  $R_f$  восьми триазиновых гербицидов в 91 различном растворителе на флуоресцирующих слоях силикагеля. Делли и др. [174] хроматографировали примерно такую же группу соединений двумя растворителями. Из трех использованных методов обнаружения (в тех случаях, когда диэтиламинные растворители непригодны) наиболее чувствительным (на уровне 0,02 мкг) оказалась обработка газообразным хлором с последующим опрыскиванием иодидом калия и крахмалом (реактив Т-207). На флуоресцирующих слоях можно определить эти соединения

в количествах порядка 0,2 мкг по гашению флуоресценции при 254 нм. Райхлинг и Фишер [175] разделяли гербициды на слоях полиамида. Лоуренс и Лейвер [176] гидролизovali триазиновые гербициды 1 н. соляной кислотой до соответствующих аминов и получали их сильнофлуоресцирующие дансилпроизводные (производные 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорида), которые хорошо разделяются методом ТСХ. Этим способом можно определить гербициды при содержании их вплоть до  $0,05 \cdot 10^{-4} \%$ .

Структурные формулы триазиновых гербицидов даны в табл. 25.9, а в табл. 25.10 приведены величины  $R_f$ , полученные для них в различных хроматографических системах. Для

Триазиновые гербициды

Таблица 25.9

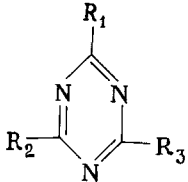
Гербицид			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Аметрин	SCH <sub>3</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Атратон	OCH <sub>3</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Атразин	Cl	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Хлоразин	Cl	N (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	N (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Десметрин	SCH <sub>3</sub>	NH-CH <sub>3</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Ипазин	Cl	N (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Прометон	OCH <sub>3</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Прометрин	SCH <sub>3</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Пропазин	Cl	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	NH- <i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Симазин	Cl	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Симетон	OCH <sub>3</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Симетрин	SCH <sub>3</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Тербутрин	SCH <sub>3</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	NH- <i>мет</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
Триэтазин	Cl	N (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
G 34690	OCH <sub>3</sub>	NH-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> -OCH <sub>3</sub>	NH-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OCH <sub>3</sub>

Таблица 25.10

Величины  $R_f \times 100$  триазиновых гербицидов, полученные в различных хроматографических системах<sup>а</sup>

Гербицид	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И
	[172]		[174]		[173]		[175]		
Аметрин	59		71	76	52	76	65	38	30
Атратон	34		36	50					
Атразин		37	68	57	44	73	56	15	12
Хлоразин		80							
Десметрин			58	50	40	60	49	48	38
Ипазин	66								
Прометон	42		45	63	41	36	78	67	60
Прометрин	68		81	76	68	88	78	30	21
Пропазин		48	75	69	56	83	67	20	5
Симазин		28	58	44	36	55	37	10	0
Симетон	26								
Симетрин	50								
Тербутрин							75	27	16
Триэтазин		60	88	69					
G 3490					5	3			

<sup>а</sup> Хроматографическая система: А — силикагель (высушен при комнатной температуре), хлороформ—нитрометан (1:1), длина пути элюирования 10 см; Б — хроматографическая система та же, но соотношение компонентов растворителя 5:1; В — силикагель G, толуол—ацетон (17:3), элюирование в течение 40 мин; Г — силикагель G, тетрагидрид углерода—абсолютно очищенный диэтиламин (19:3); Д — силикагель GF<sub>254</sub>, *n*-гексан—хлороформ—ацетонитрил (5:4:1); Е — силикагель GF<sub>254</sub>, сероуглерод—этилацетат (7:3); Ж — полиамид 6,6, петролейный эфир (40—60°C)—хлороформ (49:1); З — полиамид 11, вода—метанол—уксусная кислота (5:3:1); И — полиамид 6, вода—метанол—уксусная кислота (14:4:1).

количественного определения триазинов Штаммбах и др. [170] использовали газовую хроматографию.

Эббот и др. [177] хроматографировали смесь 8 триазиновых гербицидов в 7 растворителях на силикагеле G и в одном растворителе на смеси кизельгур—силикагель (1:1). Полученные результаты они представили в виде графиков. Содержание соединений в пробе определяли количественно по кривой зависимости квадратного корня из площади пятна от логарифма



массы пробы. В тех случаях, когда необходимо было количественное определение, пятна опрыскивали 0,5 %-ным раствором бриллиантовой зелени в ацетоне и выдерживали пластинки в парах брома.

Фишбейн [178] опубликовал обзор по всем видам хроматографии триазинов.

Хенкель и Эбинг [171] разделили также смесь следующих 6 хлорсодержащих гербицидов: гексилловый эфир 2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты (МСРА-гексил), 2-бутоксипропиловый эфир той же кислоты (МСРА-бутоксипропил); эфиры  $\alpha$ -(2-метил-4-хлорфенокси)пропионовой кислоты: гексилловый (МСРР-гексил), этиловый (МСРР-этил), 2-бутоксипропиловый (МСРР-бутоксипропил) и 3-оксипропиловый (МСРР-оксипропил). Разделение проводили двукратным элюированием смесью циклогексан—диизопропиловый эфир (5:1) на слоях силикагеля, высушенных при комнатной температуре. Эти соединения можно обнаружить опрыскиванием 0,5 %-ным раствором родамина В в этаноле с последующим визуальным наблюдением при УФ-облучении, но чувствительность такого обнаружения не очень велика — порядка 20 мкг. Значительно более эффективный способ обнаружения — опрыскивание раствором пентахлорида сурьмы в тетрахлориде углерода (1:4) с последующим нагреванием пластинок до 105°C; таким способом можно обнаружить до 0,5 мкг этих соединений в виде пятен от коричневого до фиолетового цвета.

Эббот и др. [179] разработали методику обнаружения и количественного определения тех же типов гербицидов в почве и воде. Чтобы подобрать оптимальный состав адсорбента, они испытали различные смеси кизельгура G и силикагеля G (см. т. 1, гл. 3, рис. 3.8). Наилучшего разделения эти авторы достигли на слоях, состоявших на 60 % из кизельгура G и на 40 % из силикагеля G, при элюировании смесью парафиновое масло—бензол—уксусная кислота—циклогексан (1:3:2:20). В таких условиях были разделены следующие соединения: 2,4-дихлор-, 2,4,5-трихлор- и 2-метил-4-хлорфеноксиуксусные кислоты, 4-(2-метил-4-хлорфенокси)- и 4-(2,4-дихлорфенокси)масляные кислоты и 2,2-дихлорпропионовая кислота (далапон). В эту группу хлорпроизводных были включены также 2-(1-метил-*n*-пропил)-4,6-динитрофенол (диносеб) и 2-метил-4,6-динитрофенол. Соединения экстрагировали эфиром из суспензии почвы в разбавленной серной кислоте, промывали щелочью и кислотой, концентрировали и наносили на тонкослойные хроматографические пластинки.

Экстракты диносеба Эббот и Томсон [180, 181] анализировали на клиновидных (толщиной от 2 мм до 100 мкм) слоях смеси оксида алюминия G и кизельгура G (1:1). При нанесении

экстракта на утолщенную часть слоя прежде всего адсорбировались окрашенные примеси, в результате на более тонком участке пластинки можно выделить диносеб. В этом случае экстрагирующим растворителем служила смесь метилэтилкетона и диэтилового эфира (1:1), при элюировании которой выходы значительно выше. Элюирующий растворитель для ТХС был тот же, что и указанный выше [179]. Количественное содержание диносеба определяли элюированием его метилэтилкетона с пластинки с последующим измерением поглощения элюата при длине волны 379 нм. С помощью этой комбинированной методики очистки на слоях клиновидной формы и последующего спектрофотометрического определения получены выходы от 80 до 90 % на уровне  $(0,1—0,3) \cdot 10^{-4}$  %.

Гербициды — производные фенилмочевин были разделены Хенкелем [172] на высушенных на воздухе слоях силикагеля; элюирующим растворителем служила смесь хлороформ—нитрометан (1:1). При длине пути элюирования 10 см получены следующие величины  $R_f$ : фенурон 0,31, монурон 0,41, диурон 0,53, монохлорлинурон 0,72, линурон 0,79 и небурон 0,77. После разделения эти соединения разлагали, нагревая в течение 30 мин до 150°C, и затем идентифицировали опрыскиванием *n*-диметиламинобензальдегидом. Наименьшее количество, которое можно было обнаружить, составляет примерно 1 мкг.

Таким способом можно разделять продукты термического разложения этих соединений, проводимого после нанесения их на пластинку, но перед хроматографированием. Образовавшиеся в этом случае производные анилина хроматографировали смесью хлороформ—уксусная кислота (60:1). Для определения положения пятен можно также использовать *n*-диметиламинобензальдегид, но порог чувствительности при этом снижался до 0,5 мкг. Гейсбюлер и Гросс [182] после гидролиза этих соединений диазотировали амины и затем проводили реакцию с *N*-этил-1-нафтиламином. Полученные азокрасители хроматографировали на слоях целлюлозы смесью диметилформамид—0,05 *n*. соляная кислота—этанол (3:1:1). Этот метод позволяет снизить порог чувствительности обнаружения до 0,03—0,04 мкг. Конечно, при этом не удастся различить те гербициды—производные мочевины, которые содержат одинаковые фенильные группы, т. е. диурон, линурон и небурон. Хэнс [183] определил величины  $R_f$  11 гербицидов — производных мочевины на слоях силикагеля с 14 различными растворителями (включая систему с обращенными фазами), а также времена удержания этих гербицидов при разделении методом газовой хроматографии.

Глоаб [184] исследовал разделение трифлуралина и сходных с ним соединений посредством двумерной тонкослойной

хроматографии. Трифлуралин — это избирательный предвсходный гербицид, он эффективен против большого числа сорняков, широколистных и однолетних трав. Пробы наносили на слой силикагеля GF и элюировали в одном направлении смесью бензол—1,2-дихлорэтилен (1 : 1), в другом — смесью *n*-гексан—метанол (98 : 2). При использовании естественной окраски некоторых из указанных соединений или синих пятен при поглощении ими ультрафиолетового излучения получали чувствительность обнаружения порядка 0,5 мкг. Чтобы повысить чувствительность, можно элюировать соединения с пластинки и проанализировать элюат методом газовой хроматографии.

Эббот и Уэгстаф [185] провели идентификацию активных ингредиентов гербицидов сложного состава хроматографированием на слоях смеси силикагеля с кизельгуром, элюируя пробы различными растворителями. Эбинг [186] предложил 10 хроматографических систем для рутинного разделения и идентификации 61 пестицида (в большинстве гербицидов).

Шерма [27] опубликовал обзор по хроматографии гербицидов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Schnorbus R. R., Phillips W. F., J. Agric. Food Chem., 15, 661 (1967).
- Lawrence J. H., Burke J. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 817 (1969).
- Wheeler W. D., Frier D. E. H., Mumma R. O., Hamilton R. H., Cotner R. C., J. Agric. Food Chem., 15, 227 (1967).
- Hill B. D., Stobbe E. H., J. Agric. Food Chem., 22, 1143 (1974).
- Burke J. A., Malone B., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 1003 (1966).
- Beckman H., Garber D. J., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 286 (1969).
- Watts R. R., Storch R. W., Pardue J. R., Osgood T., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 522 (1969).
- McLeod H. A., Mendoza C., Wales P., McKinley W. P., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50, 1216 (1967).
- Storch R. W., Watts R. R., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 1154 (1965).
- Hartman K. T., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50, 615 (1967).
- Bowker D. M., Casida J. T., J. Agric. Food Chem., 17, 956 (1969).
- Kadoun A. M., Bull. Environ. Contam., 3, 354 (1968).
- Abbott D. C., Thomson J., Chem. Ind. (London), 1964, 481.
- Farrow R. P., Elkins E. R., Jr., Beacham L. M., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 738 (1965).
- Thornburg W. W., J. Assoc. Off. Agr. Chem., 48, 1023 (1965).
- McKinley W. P., Coffin D. E., McCully K. A., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 863 (1964).
- Burke J. A., Mills P. A., Bostwick D. C., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 999 (1966).
- Walker K. C., Beroza M., J. Assoc. Off. Agr. Chem., 46, 250 (1963).
- Suzuki K., Miyashita K., Kashiwa T., Bull. Agric. Chem. Insp. Stn., 10, 24 (1970); Chem. Abstr., 74, 13895a (1971) (см. также [19]).
- Suzuki K., Nagayoshi H., Kashiwa T., Agric. Biol. Chem., 38, 1433 (1974).
- Suzuki K., Miyashita K., Nagayoshi H., Kashiwa T., Agric. Biol. Chem., 37, 1959 (1973).
- 20a. Suzuki K., Nagayoshi K., Kashiwa T., Agric. Biol. Chem., 38, 279 (1974).
21. Ibid., 40, 845 (1976).
- 21a. Thier H.-P., Bergner K. G., Deut. Lebensm. Rundsch., 62, 399 (1966).
22. Sandroni S., Schlitt H., J. Chromatogr., 55, 385 (1971).
23. Schechter M. S., Getz M. E., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50, 1056 (1967).
24. Kovacs M. F. Jr., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 1018 (1965).
25. Abbott D. C., Thompson J., Residue Rev., 11, 1 (1965).
26. Takeshita R., Eisel Kagaku, 17, 8 (1971); Chem. Abstr., 75, 87128t (1971).
- 26a. Hill K. R., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 1256 (1975).
27. Sherma J., "Thin-Layer Chromatography: Recent Advances", in "Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators", Vol. VII, Sherma J., Zweig G., Eds., Academic Press, New York, 1974, p. 3.
- 27a. MacNeil J. D., Frei R. W., J. Chromatogr. Sci., 13, 279 (1975).
28. Holmer D. C., Wood N. F., J. Chromatogr., 67, 173 (1972).
- 28a. Wood N. F., Analyst (London), 94, 399 (1969).
29. Suzuki K., Miyashita K., Kashiwa T., Noyaku Kensasho Hokoku, 1970, 24; Chem. Abstr., 75, 4461x (1971).
30. Abbott D. C., Tatton J. O'G., Wood N. F., J. Chromatogr., 42, 83 (1969).
31. Petrowitz H.-J., Mitt. Deut. Ges. Holzforsch., 48, 57 (1961).
32. Petrowitz H.-J., Chem. Ztg., 85, 867 (1961).
33. Petrowitz H.-J., Chem. Ztg., 86, 815 (1962).
34. Baeumler J., Rippstein S., Helv. Chim. Acta, 44, 1162 (1961).
35. Abbott D. C., Egan H., Thomson J., J. Chromatogr., 16, 481 (1964).
36. Kovacs M. F., Jr., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 46, 884 (1963).
37. Kawashiro I., Hosogai Y., Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 5, 54 (1964); Chem. Abstr., 61, 6262 (1964).
38. Yamamura J., Niwaguchi T., Proc. Japan Acad., 38, 129 (1962).
39. Deters R., Chem. Ztg., 86, 388 (1962).
40. Yamamura J., Chiba M., Obara S., Suzuki S., Kagaku Keisatsu Kenyusho Hokoku, 15, 321 (1962).
41. Morley H. V., Chiba M., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 306 (1964).
42. Taylor A., Fishwick B., Lab. Pract., 13, 525 (1964).
43. Kovacs M. F., Jr., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 1018 (1965).
44. Adams M. R., Schechter M. S., "Abstracts of Reports and Papers at the 77th Meeting, Assoc. Offic. Agric. Chemists", October 1963, p. 20.
45. Thomas E. J., Burke J. A., Lawrence J. H., J. Chromatogr., 35, 119 (1968).
46. Katz D., J. Chromatogr., 15, 269 (1964).
47. Adamović V. M., J. Chromatogr., 23, 274 (1966).
48. Moats W. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 795 (1966).
49. Ibid., 52, 871 (1969).
50. Schmit J. A., Laskaris M. L., Peters U. J., "Abstracts of Reports and Papers at the 77th Annual Meeting, Assoc. Offic. Agric. Chemists", October 1963, p. 20.
51. Ludwig E., Freimuth U., Nahrung, 8, 559 (1964).
52. Eder F., Schoch H., Mueller R., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 55, 98 (1964).
53. Niwaguchi T., Kagaku Keisatsu Kenyusho Hokoku, 14, 419 (1961); Chem. Abstr. 61, 2418 (1964).
54. Ceresia G. B., N. Y. State Dept. Health, Ann. Rept., Div. Lab. Res., 1963, 63; Chem. Abstr., 61, 13816 (1964).
55. Kawatski I. A., Frasch D. L., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 1108 (1969).
56. Eliakis C. E., Coutselinis A. S., Eliakis E. C., Analyst (London), 93, 368 (1968).
57. Szokolay A., Madarič A., J. Chromatogr., 42, 509 (1969).
58. Reynolds L. M., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 4, 128 (1969).
59. Bevenue A., Ogata J. N., J. Chromatogr., 50, 142 (1970).
60. Fehring N. V., Westfall J. R., J. Chromatogr., 57, 397 (1971).
61. Hattula M. L., Bull. Environ. Contam. Toxicol., 12, 331 (1974).
62. Bush B., Lo F.-C., J. Chromatogr., 77, 377 (1973).

63. *Fishbein L.*, *J. Chromatogr.*, **68**, 345 (1972).
64. *Prouty R. M.*, *Cromartie E.*, *Environ. Sci. Technol.*, **4**, 768 (1970).
65. *Radomski J. L.*, *Rey A.*, *J. Chromatogr., Sci.*, **8**, 108 (1970).
66. *Феклисова Л. С.*, *Журн. анал. хим.*, **26**, 1446 (1971).
67. *Alter J.*, *Dichlmann D.*, *Beydatsch R.*, *Kochler P.*, *Quaas D.*, *Spichale W.*, *Z. Anal. Chem.*, **233**, 188 (1968).
68. *Petrowitz H.-J.*, *Berghoff W.*, *Mater. Org.*, **7**, 287 (1972).
69. *Kawahra F. K.*, *Moore R. L.*, *Gorman R. W.*, *J. Gas Chromatogr.*, **6**, 24 (1968).
70. *Lauckner J.*, *Fuerst H.*, *Chem. Tech. (Berlin)*, **20**, 236 (1968).
71. *Petrowitz H.-J.*, *Wagner S.*, *Chem.-Ztg.*, **95**, 331 (1971).
72. *Бублиц Л. И.*, *Косматый Е. С.*, *Заводск. лаб.*, **36**, 1194, (1970).
73. *Gwizdek E.*, *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, **21**, 647 (1970); *Anal. Abstr.*, **21**, 4411 (1971).
74. *Косматый Е. С.*, *Вопр. питания*, **28**, 89 (1969).
75. *Fishbein L.*, *J. Chromatogr.*, **98**, 177 (1974).
76. *Fischer R.*, *Klingelhoeller W.*, *Arch. Toxikol.*, **19**, 119 (1961).
77. *Fischer R.*, *Klingelhoeller W.*, *Pflanzenschutzberichte*, **27**, 165 (1961).
78. *Askew J.*, *Ruzicka J. H.*, *Wheals B. B.*, *Analyst (London)*, **94**, 275 (1969).
79. *Ackermann H.*, *J. Chromatogr.*, **36**, 309 (1968).
80. *Ackermann H.*, *J. Chromatogr.*, **44**, 414 (1969).
81. *Antoine O.*, *Mees G.*, *J. Chromatogr.*, **58**, 247 (1971).
82. *Getz M. E.*, *Wheeler H. G.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **51**, 1101 (1968).
83. *Salo T.*, *Salminen K.*, *Fiskari K.*, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **117**, 369 (1962).
84. *Henzy H.*, *Thirion J.*, *Beitr., Tabakforsch.*, **5**, 175 (1970); *Anal. Abstr.*, **21**, 411 (1971).
85. *Kadom A. M.*, *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 542 (1970).
86. *Geldmacher-Mallinckrodt M.*, *Deut. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, **54**, 90 (1963).
87. *Geldmacher-Mallinckrodt M.*, *Weigel U.*, *Arch., Toxikol.*, **20**, 114 (1963).
88. *Stammach K.*, *Delley R.*, *Suter R.*, *Székely G.*, *Z. Anal. Chem.*, **196**, 332 (1963).
89. *Kováč J.*, *J. Chromatogr.*, **11**, 412 (1963).
90. *Kovacs M. F., Jr.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 1097 (1964).
91. *Abbott D. C.*, *Crosby N. T.*, *Thomson J.*, *Lecture to Society of Analytical Chemistry Conference, Nottingham, England, 1965.*
92. *Woggon H.*, *Spranger D.*, *Ackermann H.*, *Nahrung*, **7**, 608 (1963).
93. *Donner R.*, *Lohs Kh.*, *J. Chromatogr.*, **17**, 349 (1965).
94. *Bruaux P.*, *Dirmal S.*, *Tyomas G.*, *Ann. Biol. Clin.*, **22**, 375 (1964).
95. *Grant D. L.*, *Sherwood C. R.*, *McCully K. A.*, *J. Chromatogr.*, **44**, 67 (1969).
96. *Watts R. R.*, *Residue Rev.*, **18**, 105 (1967).
97. *Cassidy J. E.*, *Ryskiewich D. P.*, *Murphy R. T.*, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 558 (1969).
98. *Watts R. R.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **48**, 1161 (1965).
99. *Ragab T. H.*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2**, 279 (1967).
100. *Blinn R. C.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 641 (1964).
101. *Giang P. A.*, *Schechter M. S.*, *J. Agric. Food Chem.*, **8**, 51 (1960).
102. *Gardner A. M.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **54**, 517 (1971).
103. *Salamé M.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 476 (1964).
104. *Stanley C. W.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 467 (1964).
105. *Chiba M.*, *Morley H. V.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 667 (1964).
106. *Liebmann R.*, *Schuhmann H.*, *Chem. Tech. (Berlin)*, **16**, 267 (1964).
107. *Nagasawa K.*, *Yoshidome H.*, *Kamata F.*, *J. Chromatogr.*, **52**, 453 (1970).
108. *Finochiaro J. M.*, *Benson W. R.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**, 888 (1967).
109. *Geike F.*, *J. Chromatogr.*, **53**, 269 (1970).
110. *Geike F.*, *J. Chromatogr.*, **58**, 257 (1971).

111. *Mendoza C. E.*, *Shields J. B.*, *J. Chromatogr.*, **50**, 92 (1970).
112. *MacNeil J. D.*, *Hikichi M.*, *J. Chromatogr.*, **101**, 33 (1974).
113. *Frei R. W.*, *Lawrence J. F.*, *Belliveau P. E.*, *Z. Anal. Chem.*, **254**, 271 (1971).
114. *Spickett R. G. M.*, *Chem. Ind. (London)*, **1957**, 561.
115. *Kirchner J. C.*, *Miller J. M.*, *Keller G. J.*, *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
116. *Stahl E.*, *Arch. Pharm.*, **293/65**, 531 (1960).
117. *Miller J. M.*, *Kirchner J. C.*, *Anal. Chem.*, **25**, 1107 (1953).
118. *Olive B. M.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 915 (1973).
119. *Nash N.*, *Allen P.*, *Revenue A.*, *Beckmann H.*, *J. Chromatogr.*, **12**, 421 (1963).
120. *Doi Y.*, *Kagaku Keisatsu Kenkyusho Hokoku*, **16**, 51 (1963).
121. *Kroeller E.*, *Deut. Lebensm. Rundsch.*, **65**, 41 (1969).
122. *Delfel N. E.*, *Tallent W. H.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **32**, 182 (1969).
123. *Tyihák E.*, *Vágujfalvi D.*, *Acta Biol. Acad. Sci. Hung., Suppl.*, **5**, 77 (1963).
124. *Nalbandov O.*, *Yamamoto R. T.*, *Fraenkel G. S.*, *J. Agric., Food Chem.*, **12**, 55 (1964).
125. *Blinn R. C.*, *Gunther F. A.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **46**, 204 (1963).
126. *Wagner J. G.*, *Welling P. G.*, *Lee K. P.*, *Walker J. E.*, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 666 (1971).
127. *Welling P. G.*, *Lee K. P.*, *Khanna U.*, *Wagner J. G.*, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1621 (1970).
128. *Wagner J. G.*, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1272 (1971).
129. *Ramaut J. L.*, *Benoit A.*, *J. Pharm. Belg.*, **21**, 293 (1966).
130. *Russel H. A.*, *Z. Anal. Chem.*, **250**, 125 (1970).
131. *Janicki C. A.*, *Brenner R. J.*, *Schwartz B. E.*, *J. Pharm., Sci.*, **55**, 1077 (1966).
132. *Perry V. A.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**, 737 (1970).
133. *Beroza M.*, *J. Agric. Food Chem.*, **11**, 51 (1963).
134. *Gunner S. N.*, *J. Chromatogr.*, **40**, 85 (1969).
135. *Fishbein L.*, *Fawkes J.*, *Falk H. L.*, *Thompson S.*, *J. Chromatogr.*, **31**, 102 (1967).
136. *Lichenstein E. P.*, *Lang T. T.*, *Schulz K. R.*, *Schnoes K. R.*, *Carter G. T.*, *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 658 (1974).
137. *Fischbein L.*, *Fawkes J.*, *Falk H. L.*, *Jordan S.*, *J. Chromatogr.*, **37**, 256 (1968).
138. *Fischbein L.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 238 (1975).
139. *Fischbein L.*, *Falk H. L.*, *Kotin P.*, *Chromatogr. Rev.*, **10**, 175 (1968).
140. *Kirchner J. G.*, *Miller J. M.*, *Rice R. C.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 1031 (1954).
141. *Salo T.*, *Maekinen R.*, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **125**, 170 (1964).
142. *Gaenshirt H.*, *Morianz K.*, *Arch. Pharm.*, **293/65**, 1065 (1960).
143. *Rangone R.*, *Ambrosio C.*, *J. Chromatogr.*, **50**, 436 (1970).
144. *Salo T.*, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **124**, 448 (1964).
145. *Copius-Peereboom J. W.*, *Beekes H. W.*, *J. Chromatogr.*, **14**, 417 (1964).
146. *Covello M.*, *Schettino O.*, "The Application of Thin-Layer Chromatography to Investigations of Antifermentatives in Foodstuffs", in "Thin-Layer Chromatography", *Marini-Bettolo G. B.*, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 215.
147. *Covello M.*, *Schettino O.*, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **41**, 337 (1964); *Chem. Abstr.*, **61**, 15260 (1964).
148. *Baehler B.*, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 309 (1962).
149. *Gosselé J. A. W.*, *J. Chromatogr.*, **63**, 433 (1971).
150. *Nagasawa K.*, *Yoshidome H.*, *Takeshita R.*, *J. Chromatogr.*, **43**, 473 (1969).
151. *Chiang H.-C.*, *J. Chromatogr.*, **44**, 201 (1969).
152. *Bajaj I.*, *Verma K. K.*, *Prakash O.*, *Parihar D. B.*, *J. Chromatogr.*, **46**, 261 (1970).

154. Von Stryk F. G., J. Chromatogr., 72, 410 (1972).
155. Абдуллаев Ш., Генкина Г. Л., Атакузиев А. А., Шакиров Т. Т., Қадыров Ч. Ш., Журн. анал. хим., 30, 363 (1975).
156. Sherma J., J. Chromatogr., 104, 476 (1975).
157. Baker P. B., Farrow J. E., Hoodless R. A., J. Chromatogr., 81, 174 (1973).
158. Porter W. G., J. Chromatogr., 28, 469 (1967).
159. Briggs C. J., Challen S. B., J. Sci. Food Agric., 18, 602 (1967).
160. Fishbein L., Fawkes J., Jones P., J. Chromatogr., 23, 476 (1966).
161. Rhodes R. C., Pease H. L., Brantley R. K., J. Agric. Food Chem., 19, 745 (1971).
162. Sieper H., Pies H., Z. Anal. Chem., 242, 234 (1968).
163. Otteneder H., Hezel U., J. Chromatogr., 109, 181 (1975).
164. Tatton J. O' G., Wagstaffe P. J., J. Chromatogr., 44, 284 (1969).
165. Geike F., Schuphan I., J. Chromatogr., 72, 153 (1972).
166. Fishbein L., Fawkes J., J. Chromatogr., 19, 364 (1965).
167. Czeglédi-Jankó G., J. Chromatogr., 31, 89 (1967).
168. Sherma J., J. Chromatogr., 113, 97 (1975).
169. Bache C. A., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 355 (1964).
170. Stambach K., Kilchner H., Friedrich K., Larsen M., Szekely G., Weed Res., 4, 64 (1964).
171. Henkel H. G., Ebing W., J. Chromatogr., 14, 283 (1964).
172. Henkel H. G., Chimia (Aarau), 18, 252 (1964).
173. Manner L. P., J. Chromatogr., 21, 430 (1966).
174. Delley R., Friederick K., Karlsruher B., Székely G., Stambach K., Z. Anal. Chem., 228, 23 (1967).
175. Reichling J., Fischer H., J. Chromatogr., 115, 670 (1975).
176. Lawrence J. F., Laver G. W., J. Chromatogr., 100, 175 (1974).
177. Abbott D. C., Bunting J. A., Thomson J., Analyst (London), 90, 356 (1965).
178. Fishbein L., Chromatogr. Rev., 12, 167 (1970).
179. Abbott D. C., Egan H., Hammond E. W., Thomson J., Analyst (London) 89, 480 (1964).
180. Abbott D. C., Thomson J., Chem. Ind. (London), 1964, 481.
181. Abbott D. C., Thomson J., Analyst (London), 89, 613 (1964).
182. Geisbuehler H., Gross D., J. Chromatogr., 27, 296 (1967).
183. Hance R. J., J. Chromatogr., 44, 419 (1969).
184. Golab T., J. Chromatogr., 18, 406 (1965).
185. Abbott D. C., Wagstaffe P. J., J. Chromatogr., 43, 361 (1969).
186. Ebing W., J. Chromatogr., 65, 533 (1972).

## Глава XXVI

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА \*

## 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАРКОТИКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ

Быстрое обнаружение и идентификация наркотиков в биологических материалах — задача чрезвычайно важная; во многих случаях это необходимо для спасения жизни. Идентифицировать наркотики методом ТСХ можно достаточно быстро, но из-за присутствия в пробе других наркотических и даже не наркотических соединений можно получить ложный ответ. Поэтому следует помнить, что определенная величина  $R_f$  или данная цветная реакция — такой показатель, который еще необходимо подтвердить. Способы подтверждения могут быть различными: параллельный анализ с использованием различных хроматографических систем, спектрофотометрический анализ, ГХ, определение температуры плавления, микрокристаллографический анализ, методика многократного опрыскивания различными реагентами, иммунологические испытания и т. д. В качестве обязательного контрольного испытания должна применяться не ТСХ, а другой метод. Однако ТСХ весьма эффективна в тех случаях, когда необходимо исследовать большое число проб, как, например, при анализе мочи на наличие в ней наркотиков. Проводя разделение, можно очень быстро отсортировать пробы, не содержащие наркотиков, и одновременно получить некоторое представление о составе проб, давших положительные результаты. На сложных дорогостоящих установках для газовой хроматографии и высокопроизводительной жидкостной хроматографии одновременный анализ многих проб провести невозможно.

Концентрирование образцов и извлечение из них наркотиков проводится различными методами. Как правило, предпочтительно анализировать мочу, хотя некоторые соединения, например барбитураты — амилбарбитон и пентабарбитон, нельзя обнаружить в моче в неизмененном виде [1]. Поэтому следует помнить, что в моче могут находиться не сами наркотики, а их

\* Обширный материал по анализу лекарственных средств методом ТСХ приведен в книге: Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч., Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Пер. со слов.— М.: Мир, 1980.— Прим. ред.

метаболиты или конъюгаты [2]. Обнаружение специфических метаболитов может служить дополнительным доказательством того, что наркотик был введен.

Дол и др. [3] извлекали наркотики из мочи, адсорбируя их на ионообменной смоле, нанесенной на бумагу, а затем экстрагировали эти соединения органическими растворителями при строго определенном pH. Этой методикой пользовались Мюле [2], Монтальво и др. [4], а также Хитон и Бламберг [5]. Мюле помещал квадратики (5×5 см) бумаги с ионообменной смолой Reeve Angel SA-2 вместе с 50 мл мочи (pH 5—6) в банки емкостью по ~120 мл и перемешивал в течение 30 мин. Затем сливал мочу и промывал дважды бумагу дистиллированной водой. Чтобы извлечь барбитураты, бумагу SA-2 встряхивают 10 мин с 20 мл цитратного буферного раствора (pH 2,2) и 10 мл хлороформа. Потом фазы разделяют и проводят в течение 1 мин дополнительную экстракцию 10 мл хлороформа. Анальгетики и психотропные соединения извлекают, встряхивая бумагу, на которой адсорбирован наркотик, в течение 10 мин с 20 мл боратного буферного раствора (pH 9,3) и 20 мл смеси хлороформ—изопропанол (3:1). *d*-Амфетамин и его аналоги извлекают посредством 10-минутного встряхивания с 20 мл карбонатного буферного раствора (pH 11,0) и 20 мл хлороформа. После разделения фаз к хлороформной фазе добавляют 0,05—0,1 мл ледяной уксусной кислоты. Все органические фазы выпаривают досуха и растворяют сухие остатки в 25—50 мкл метанола или хлороформа. Таким способом нельзя обнаружить в моче метадон при концентрации его не менее 5—10 мкг/мл из-за сложности экстрагирования. Описанный метод непригоден также для обнаружения эфедрина, фенметразина, псильцибина, глутетимида, хлорпромазина, амида лизергиновой кислоты, марихуаны и некоторых барбитуратов. Экстракция амфетаминов с бумаги, покрытой ионообменной смолой, дала ошибочные результаты [5]. Каиста и Джаффе [6] пришли к выводу, что такая методика удобна для сопоставления проб мочи, взятых в различное время у одного и того же больного, так как она позволяет сократить стоимость анализов, не снижая их чувствительности. По мнению этих авторов, данный метод предпочтителен по сравнению с прямой экстракцией, если для анализа имеется не менее 50 мл мочи.

Другой метод экстракции — непосредственное разделение между жидкими фазами. Мюле [2] использовал этот метод и экстрагировал по 15 мл мочи при тех же значениях pH и тех же объемах растворителя, которые применяются в описанном выше экстрагировании с бумаги; лишь при обнаружении *d*-амфетамина и его аналогов Мюле пользовался только 10 мл растворителя. Экстракцию он проводил в закупоренных стеклян-

ных центрифужных пробирках при 15-минутном встряхивании с частотой 300 колебаний в минуту. В образцах объемом по 15 мл удалось обнаружить почти все испытанные наркотические средства; чувствительность определения составляла 1—2 мкг/мл. Серфонтейн и др. [7] разработали методику микрофазной экстракции органическими растворителями из растворов, содержащих водные буферы с различными pH, а также экстракцию из органических фаз различными водными буферными растворами. Эта методика позволяет исключить стадию концентрирования и при этом получить более «чистые» хроматограммы. Бройч и др. [8] экстрагировали кислотно-нейтральные и основные фракции из отдельных проб мочи объемом по 2 мл. После извлечения хлороформом кислотно-нейтральной фракции экстракт промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, чтобы извлечь из него мешающие примеси.

Фуджимото и Уанг [9] предложили применять смолу амберлит XAD-2 (производства фирмы Rohm and Haas) для выделения анальгетиков из мочи, а Мюле и др. [10—12] усовершенствовали эту методику и распространили ее на другие лекарственные вещества. В окончательном варианте эта методика включает следующие операции. Ионообменную смолу промывают, перемешивая сначала с 4 объемами ацетона, затем 3 раза с 3 объемами метанола и 3 раза с 3 объемами дистиллированной воды. Промытую ионообменную смолу выдерживают от 7 до 14 сут под слоем воды в холодильнике, после чего дважды промывают 1 объемом воды и загружают в колонку. Через колонку размером 135×10 мм, заполненную суспензией смолы XAD-2 (1,8 г сухой смолы), в течение 20—25 мин пропускают 25 мл мочи, pH которой предварительно доводят до 8—9, добавляя 10 %-ный раствор гидроксида натрия. Чтобы выделить кислотные и основные компоненты из колонки, проводят два отдельных элюирования. Сначала через колонку пропускают 10 мл изопропилового эфира и собирают элюат в 50-миллилитровую центрифужную пробирку, содержащую 1 мл 0,1 н. соляной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают встряхиванием в смесителе Genie Vortex. После отстаивания отделившийся водный слой вымораживают, эфирный слой сливают и, выпарив диизопропиловый эфир, получают остаточный концентрат, содержащий главным образом кислоту и некоторые нейтральные компоненты лекарственного препарата. Далее колонку элюируют двумя порциями по 10 мл смеси хлороформ—диизопропиловый эфир (3:1), элюат собирают непосредственно в ту пробирку, где находится водный слой, полученный при первом экстрагировании. В эту пробирку добавляют 1 мл 0,125 м раствора буры до pH от 8 до 9,5. После встряхивания в смесителе отбирают верхнюю водную фазу, а к органической

фазе добавляют 0,2 мл 6 н. раствора соляной кислоты в метаноле. Выпариванием при 80°C в токе воздуха получают остаток, содержащий главным образом основные и некоторые нейтральные компоненты препарата. Вайсман и др. [12а] анализировали пробы мочи объемом по 5 мл, используя экстракцию в колонке со смолой, и получили следующие значения порога чувствительности: амфетамины и барбитураты 0,4 мкг/мл, алкалоиды 0,8 мкг/мл.

Бройч и др. [13] выделяли лекарственные средства из мочи, лиофилизуя пробу объемом 5 мл после добавления 2 мл ледяной уксусной кислоты. Лиофилизированный остаток смешивали с 3 мл метанола и оставляли отстаиваться в течение часа. Далее к смеси добавляли 9 мл ацетона, смесь фильтровали и выпаривали фильтрат досуха. Полученный остаток можно либо сразу разделить методом ТСХ на кислотные, нейтральные и основные компоненты, либо провести предварительное разделение. Для этого остаток смешивают с 10 мл эфира, оставляют на 30 мин и фильтруют. При этом в фильтрате остаются кислотные и нейтральные компоненты и, возможно, небольшие количества ацетатов кодеина, хинина или, например, метадона. Остаток, не попавший в фильтрат, растворяют в метаноле, чтобы выделить основные лекарственные препараты. Этот метод после некоторой его модификации применяли для выделения наркотиков и лекарственных средств из желчи, для анализа которой неприемлема непосредственная экстракция [14].

Меола и Ванко [15] концентрировали наркотические средства из проб мочи, адсорбируя их на смоченном буферным раствором древесном угле после добавления к пробе карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (рН 11,0). Барбитураты, глутетимид и кокаин извлекали с угля диэтиловым эфиром, а амфетамины, алкалоиды и другие наркотики — смесью хлороформ—изопропанол.

Чаще всего для разделения таких лекарственных средств после извлечения их из мочи используются следующие смеси: этанол—диоксан—бензол—аммиак (5:40:50:5) [2], этилацетат—метанол—аммиак (85:10:5 и 85:10:1) [2, 8], метанол—*n*-бутанол—бензол—вода (60:15:10:15) [2], хлороформ—ацетон (9:1) [2], гексан—этанол (93:7) [8], этилацетат—метанол—вода—аммиак (85:10:3:1) [10] и хлороформ—метанол—аммиак [10]. Для отдельных классов соединений можно подобрать дополнительные растворители.

Обнаруживают лекарственные средства и наркотики обычно последовательным опрыскиванием хроматограмм несколькими реагентами. Например, Бройч и др. [8] сначала обнаруживают кислотные и нейтральные соединения УФ-облучением (непродолжительное выдерживание в парах аммиака увеличивает поглощение в УФ-области). Затем закрывают площадь над стандартом (фенобарбиталом) и обрабатывают оставшуюся часть пластинки *N*-2,6-трихлорбензохинониминном (реактив Т-265); при этом барбитураты и структурно подобные им соединения дают пурпурные или фиолетовые пятна. Далее опрыскивают всю пластинку раствором нитрата ртути(I) (реактив Т-161), чтобы усилить окраску пятен барбитуратов и обнаружить пятна метилприлона, этинамата и карбромаля. После этого пластинку опрыскивают раствором 1 г ванилина в смеси 100 мл метанола и 2 мл концентрированной серной кислоты и слегка нагревают. В результате такой обработки появляются желтые пятна мепробамата, переходящие в черные при опрыскивании раствором 0,5 мл фурфурала в 50 мл метанола и 2 мл концентрированной соляной кислоты. Пластинку с основными компонентами опрыскивают 0,1 %-ным раствором нингидрина в метаноле и слегка нагревают, чтобы обнаружить амфетамин в виде желтого пятна. Облучение УФ-светом с длиной волны 360 нм в течение 10 мин позволяет обнаружить метамфетамин в виде фиолетового, а амфетамин в виде красно-фиолетового пятен. В заключение пластинку опрыскивают реактивом на основе иодоплатината (Т-149), сушат на воздухе и опрыскивают реактивом Драгендорфа (Т-111). Авторы работы [8] приводят список цветных реакций для 31 соединения. Для индивидуальных классов соединений можно подобрать дополнительные обнаруживающие реагенты.

Каиста и Тадрус [16] сравнивают стоимость и затраты времени при исследовании проб мочи ТСХ и другими методами, а Каиста [17] опубликовал обзор методик обнаружения наркотиков. Сан и др. [18] обобщили препаративные методики обнаружения наркотиков. Этому же вопросу посвящены два библиографических списка [19, 19а].

## 2. СНОТВОРНЫЕ СРЕДСТВА

В связи с широким применением производных барбитуровой кислоты и других снотворных необходимо располагать таким методом анализа, с помощью которого можно было бы быстро идентифицировать тот или иной препарат. Многие исследователи пытались использовать для этой цели ТСХ. Мачата [20] показал, что барбитураты можно разделять на слоях силикагеля, элюируя смесью эфир—хлороформ (3:17). Беумлер и Рипштейн [21] разделили на силикагеле смесь 17 снотворных, взяв в качестве элюирующего растворителя смесь хлороформ—ацетон (9:1). Для обнаружения пятен пластинки опрыскивали раствором нитрата ртути(I).

Поргес [22] описал разделение барбитуратов на слоях кислого, щелочного и нейтрального силикагеля. Рейш и др. [23] привели величины  $R_f$  семи барбитуратов в двух различных растворителях на тонких слоях, полученных смешением ионообменной смолы и силикагеля G (1:9). При анализе таблеток, содержащих смеси барбитуратов, проводили предварительное разделение образца на колонке с катионообменной смолой, элюируя кислотные компоненты 40 %-ным метанолом. Далее смесь метанола и аммиака элюировали основные компоненты. Обнаруживают производные барбитуровой кислоты, опрыскивая пластинки сначала 1 %-ным раствором нитрата серебра, а затем 1 %-ным раствором нитрата ртути(I). Фрам и др. [24, 25], хроматографируя образцы на слоях силикагеля G в камерах с насыщенной атмосферой, обнаружили и идентифицировали 18 наркотиков, в том числе 12 барбитуратов и 6 соединений других групп, используемых как снотворные средства. Эти соединения и продукты их разложения были выделены из подкисленной мочи экстракцией эфиром. Элюирующий растворитель для ТСХ представлял собой смесь изопропанол—25 %-ный гидроксид аммония—хлороформ (9:2:9). Нивагучи и Оки [26] идентифицировали «небарбитуратные» средства на пластинках с закрепленным крахмалом слоем кремневой кислоты. В качестве растворителей они использовали смесь ацетон—дихлорэтилен (3:17) и бензол—диоксан—28 %-ный гидроксид аммония (15:4:1). Сали и Эш [27] хроматографировали 13 барбитуратов и несколько производных гидантона на силикагеле G со смесями бензол—диоксан (5:2), хлороформ—ацетон (9:1) и бензол—эфир (1:1). Разделенные соединения обнаруживали опрыскиванием 1 %-ным раствором нитрата ртути(I). Шеллард и Осисиогу [28] разделили 12 барбитуратов на силикагеле G, пользуясь для идентификации двумя, а иногда тремя различными системами растворителей, в том числе хлороформом, смесями диизопропиловый эфир—хлороформ—циклогексан (2:2:1), диизопропиловый эфир—хлороформ—бензол (13:8:4), диизопропиловый эфир—хлороформ (1:1), изопропанол—хлороформ—28 %-ный гидроксид аммония (9:9:2), диизопропиловый эфир—бензол—диэтиловый эфир (2:2:1), ацетон—бензол (1:1) и диизопропиловым эфиром. Для обнаружения барбитуратов пластинки опрыскивали 5 %-ным раствором нитрата кобальта в этаноле и затем выдерживали в парах аммиака.

Карри и Фокс [29] разделили группу барбитуратов на слоях целлюлозы, пропитанных методом погружения 10 %-ным раствором ортофосфата натрия, применяя в качестве элюирующего растворителя *n*-амилметилкетон; Дуткевич и Кончалик [30]

пользовались слоями целлюлозы, пропитанными нитратом аммония, и смесью изопропанол—хлороформ—20 %-ный гидроксид аммония (6:3:2). В работе [31] описано разделение барбитуратов на полиамиде при элюировании такими смесями, как хлороформ—диэтиловый эфир—уксусная кислота (4:1:0,05) и диэтиловый эфир—*n*-гексан—хлороформ—уксусная кислота (2:1:1:0,05). Обнаруживали пятна на слоях полиамида опрыскиванием 0,005 %-ным раствором флуоресцеина в 0,5 н. гидроксиде натрия и наблюдали их в УФ-свете. Чувствительность обнаружения составляла 0,5—1 мкг.

Розенталь и др. [32] использовали слой силикагеля G и кислотный растворитель; хроматографирование вели в камере, заполненной парами аммиака, в результате чего достигалось постепенное уменьшение кислотности по мере продвижения фронта растворителя и, таким образом, улучшалось разделение барбитуратов. Растворителем служила смесь хлороформ—бутанол—муравьиная кислота (140:80:7).

Беумлер и Риппштейн [33] разделили на тонких слоях силикагеля G карбромал и два его метаболита, элюируя пробу смесью хлороформ—ацетон (9:1), и получили следующие величины  $R_f$ : карбромал 0,65, 2-этил-2-оксимасляная кислота 0,30 и 2-этилбутирилмочевина 0,25. Реактив для опрыскивания на основе нитрата ртути(I) не слишком чувствителен к карбромалу, поэтому авторы заменили его на реактив Т-94, предназначенный для обнаружения инсектицидов, который позволяет обнаруживать от 5 мкг карбромала. Для обнаружения 2-этилбутирилмочевины пластинку помещали на 5 мин в пары хлора и затем опрыскивали реактивом Т-94, при этом на пластинке появлялось фиолетовое пятно. Остальные продукты метаболизма карбромала можно обнаружить, опрыскивая пластинки кислым раствором перманганата калия; в результате опрыскивания на красноватом фоне появляется зеленое пятно.

Линдфорс и Руохонен [34] применили такую же хроматографическую систему для разделения карбромала и бромизовалюма. Для последнего получено  $R_f$ , равное 0,37, а для 3-метилбутирилмочевины (продукта метаболизма бромизовалюма) 0,17. Разделенные соединения эти авторы обнаруживали следующим образом. Помещали хроматограммы на 5 мин в хлор, удаляли избыток хлора и нагревали 10 мин при 105°C, после чего пластинки опрыскивали смесью 100 мл 0,5 %-ного раствора бензидинацетата и 2 мл 10 %-ного иодида калия. Этот реагент вызывает образование серо-фиолетовых пятен; порог чувствительности менее 0,5 мкг. Линдфорс [35] приводит следующие величины  $R_f$  для смеси «небарбитуратных» снотворных, разделенных на силикагеле смеси хлороформа и диэтилового эфира

(17:3): ацетилкарбомал 0,39, апонал 0,22, бромизовалюм 0,23, 3-метилбутирилмочевина 0,10, карбомал 0,54, 2-этилбутирилмочевина 0,18, этинамат 0,50 и глутетимид 0,66.

Феркрус [36] использовал силикагель и смесь петролейный эфир—метанол (1:1) для обнаружения глутетимида в патологоанатомическом материале. В этом случае с помощью реагента Драгендорфа можно обнаружить примерно 10 мкг соединения.

Генширт [37] исследовал действие ряда реагентов, применявшихся для обнаружения противоневралгических и снотворных средств. Как правило, последние можно обнаружить с помощью аммиачного раствора нитрата серебра или раствора иодид калия—бензидин, которыми опрыскивают пластинки, предварительно выдержанные в парах хлора, или используя флуоресцирующие слои.

Леман и Карамустафаоглу [38] разработали методику анализа сыворотки крови на барбитураты. Согласно этой методике, барбитураты экстрагируют хлороформом из подкисленной сыворотки, взбалтывая 15 мл хлороформа, 0,1 мл концентрированной соляной кислоты, 3 мл сыворотки и 2 г безводного сульфата натрия. После отделения экстракта 10 мл раствора в хлороформе упаривают на водяной бане досуха. Остаток растворяют в 0,2 мл этанола, наносят на пластинку с силикагелем G и элюируют в камере, облицованной изнутри фильтровальной бумагой, применяя в качестве растворителя смесь хлороформ—*n*-бутанол—гидроксид аммония (70:40:3,5). (Примечание. Хлороформ содержит 1% этанола в качестве стабилизатора.) Внутри хроматографической камеры помещают маленький стаканчик с концентрированным гидроксидом аммония для того, чтобы атмосфера в камере была насыщена аммиаком. Если это условие не выполняется, то разделение будет не таким четким и для всей группы разделяемых соединений будут получены завышенные величины  $R_f$ . Для обнаружения пятен можно использовать два реагента: 0,05%-ный раствор перманганата калия для обнаружения ненасыщенных соединений или комбинированное опрыскивание сначала 0,1%-ным раствором симм-дифенилкарбазида в 95%-ном этаноле, а затем 0,33%-ным раствором нитрата ртути(I) в 0,04 н. азотной кислоте. В последнем случае пластинки выдерживают на солнечном свете или облучают УФ-светом, чтобы высветлить фон, на котором места концентрирования выделенных соединений обнаруживаются в виде четких фиолетовых пятен. Авторы отмечают, что, как и в хроматографии на бумаге, быстродействующие барбитураты характеризуются большими величинами  $R_f$ .

Петцольд и др. [40] использовали растворитель, состоящий из ацетона, *n*-бутанола и гидроксида аммония (9:9:2). Эти

авторы наносили на пластинки по два пятна одного и того же образца. Одно пятно до хроматографирования обрабатывали на пластинке 5 мкл 4 н. серной кислоты и нагревали в течение часа при 125°C. Для 5 из числа исследованных барбитуратов такая обработка существенно меняла величины  $R_f$ , так что разделение значительно улучшалось. При извлечении барбитуратов из крови хлороформный экстракт пробы пропускали через колонку с флоризилом и затем элюировали 10%-ным раствором метанола в хлороформе. Элюат выпаривали досуха, остаток растворяли 0,1 мл этанола и наносили пробу на пластинку с силикагелем. Келлегер и Ролласон [41] пользовались микрохроматографическими пластинками для обнаружения барбитуратов в крови. Де Зееув и Вийсбеек [42] до хроматографирования проводили на слое адсорбента реакцию с бромом, чтобы облегчить идентификацию близких по строению тиобарбитуратов и барбитуратов.

Среди многочисленных статей, посвященных разделению соединений этой группы, автор монографии выбрал три и составил таблицу (табл. 26.1) приведенных в этих статьях величин  $R_f$ . Разделение во всех описанных примерах проводилось на силикагеле, но с самыми различными комбинациями растворителей. Кочин и Дейли [43] использовали три растворителя, с которыми можно проводить двумерное хроматографирование, и два обнаруживающих реагента, особенно полезных в тех случаях, когда получаются очень близкие величины  $R_f$ . Амобарбитал и пентобарбитал не удается разделить даже методом двумерного хроматографирования. Добиться их разделения можно только с помощью описанной выше методики Петцольда и др. [40]. Величины  $R_f$  амобарбитала и пентобарбитала после кислотной обработки соответственно равны 0,74 и 0,40. В ряде работ показаны хроматограммы, полученные при изучении процесса выделения различных лекарственных препаратов из организма. На хроматограммах видны как исходные соединения, так и продукты их метаболизма. Саншайн и др. [44], помимо опрыскивания перманганатом калия, применяли для обнаружения всех перечисленных ими соединений комбинированное опрыскивание сначала раствором сульфата ртути, а затем 0,001%-ным раствором дифенилкарбазида в хлороформе (масса/объем). Перед опрыскиванием перманганатом можно провести дополнительное опрыскивание раствором флуоресцеина натрия, позволяющее обнаруживать соединения при УФ-облучении. Однако хроматографирование на флуоресцирующих слоях гораздо удобнее, чем опрыскивание флуоресцирующим раствором [45].

Эберхардт и др. [46] наблюдали появление метаболитов 11 лекарственных соединений, анализируя пробы мочи, взятые



Таблица 26.1

Величины  $R_f$  и цветные реакции некоторых снотворных средств, полученные на силикагеле G с различными растворителями

Снотворное	Растворители <sup>а</sup>					Цветные реакции В, Г	
	А [43]	Б [43]	В [43]	Г [46]	А <sup>б</sup> [44]	х [44]	у [46]
Барбитал	0,50	0,38	0,40	0,25	1,00	ф.	сер.
Фенобарбитал	0,50	0,36	0,26	0,1	1,00	ф.	сер.
Циклобарбитал	0,68	0,55	0,38	0,2	+ <sup>д</sup>	с.	сер.
Винбарбитал					1,19	ф.	
Гептабарбитал				0,2	1,32	ф.	сер.
Бутабарбитал	0,62	0,49	0,52		1,28	ф.	
Амобарбитал	0,60	0,42	0,52		1,44	ф.	
Апробарбитал					1,30	с.	
Аллобарбитал	0,55	0,43	0,48		1,30	с.	
Пентобарбитал	0,57	0,40	0,49		1,42	ф.	
Аллилбарбитуровая кислота					1,44	с.	
Секобарбитал	0,64	0,46	0,54		1,67	с.	
Гексобарбитал	0,77	0,49	0,58		2,06	ф.	
Метарбитал	0,85	0,53	0,66		2,35	ф.	
Мефабарбитал	0,98	0,85	0,60		2,37	ф.	
Тиопентал	0,94	0,73	0,70		+		
Тиамиал	0,95	0,80	0,70		+	с.	
Итобарбитал	0,67	0,48	0,50				
Циклопал					1,38	с.	
Бутетал					1,41	ф.	
Талбутал					1,41	с.	
Буталлионал					1,50	с.	
Гексетал					1,56	ф.	
Сигмодал					1,77	ф.	
Метиприлон	0,50	0,81	0,45	0,5			к.
Глутетимид	0,80	0,54	0,99	0,9			сер.
Этинамат	0,81	0,65	0,55				
Этхлорвинол	0,95	0,32	0,95				
Дигидроприлон				0,4			сер.

Продолжение табл. 26.1

Снотворное	Растворители <sup>а</sup>					Цветные реакции В, Г	
	А [43]	Б [43]	В [43]	Г [46]	А <sup>б</sup> [44]	х [44]	у [46]
Карбромал				0,75			б.
Этинамат				0,6			кор.
Бромизовалюм				0,45			кр.
2-Метил-3-о-толил-4(3Н)-хиназолинон				0,8			б.

<sup>а</sup> А — хлороформ—ацетон (9:1), длина пути элюирования 10 см; Б — бензол—уксусная кислота (9:1), 10 см [43]; В — диоксан—бензол—гидроксид аммония (4:15:1), разделение в насыщенной атмосфере, длина пути элюирования 10 см [43]; Г — пиперидин—петролейный эфир (50—70°C) (1:5) [46].

<sup>б</sup> Величины  $R_{st}$ , отнесенные к фенобарбиталу.

<sup>в</sup> х — окраска пятен после опрыскивания смесью сульфат ртути—дифенилкарбазон (см. текст) [44]; у — окраска пятен после опрыскивания 1%-ным раствором нитрата ртути(I) на силикагеле, содержащем эозин [46].

<sup>г</sup> Окраска пятен: ф.—фиолетовая, с.—синяя, сер.—серая, к.—красная, кор.—коричневая, б.—белая. Соединения, для которых не указана окраска пятен, можно обнаружить с помощью 0,2 %-ного перманганата калия.

<sup>д</sup> + — вещество движется вместе с фронтом растворителя.

через 3, 6, 12 и 24 ч. Величины  $R_f$  этих продуктов даны в табл. 26.1 вместе с  $R_f$  исходных соединений.

Дийкхюис [47] определял положение пятен барбитуратов на хроматограммах, проводя временное гашение флуоресценции парами аммиака. Эта реакция очень избирательна и позволяет снизить порог чувствительности обнаружения до 0,2 мкг.

### 3. ПСИХОТРОПНЫЕ СРЕДСТВА

#### Транквилизаторы

Эта группа веществ сразу приобрела большое значение и получила широкое распространение. К ней, в частности, относятся и алкалоиды раувольфии, о которых говорилось в разд. 10 гл. XV (т. 1). При лечении психических расстройств чаще всего пользуются производными фенотиазина.

Беумлер и Риппштейн [21] разделили несколько таких соединений на слоях силикагеля, элюируя пробы смесью метанол—ацетон—триэтанолламин (1:1:0,03) (табл. 26.2). Положения пятен они наблюдали в УФ-свете или опрыскивали пластинки хлоридом палладия и модифицированным реагентом Драгендорффа. Паулюс и др. [48] анализировали подобную смесь на

Величины  $R_f \times 100$  производных феноксиамина и других лекарственных средств аналогичного назначения, полученные на силикагеле G с различными растворителями, а также цветные реакции, вызываемые действием серной кислоты

Лекарство	Растворитель <sup>а</sup>										Окраска пятен			
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К		Л	М	
Ацетофеназин	12	36	4	52	18	38								Оранжево-розовая <sup>б</sup>
Бутирилперазин	8	31	6	28	10	45							5	"
Хлорпромазин	37	44	28	14	23	66	94	70	30	86				Красновато-розовая <sup>в</sup>
Хлорпромазинсульфоксид	5	10	1	9	5	27	26	47	19	86				"
Хлорпрогексен	34	78		20	36	88	80	73	46	68				Светло-оранжевая <sup>в</sup>
N-Деметилхлорпропазинсульфоксид							20	56	10					Красновато-розовая <sup>в</sup>
Диэтазин							23	68	18	72				Красная <sup>г</sup>
N,N-Дидеметилхлорпромазинсульфоксид													94	Красновато-розовая <sup>в</sup>
Этопропазин	37	56	9	68	27	57	34	58	68				72	Оранжевая <sup>в</sup>
Флуфеназин													84—86	Синяя <sup>г</sup>
Левомепромазин													45	—
Либриум	29	46	13	13	13	62	88	57	29					Оранжевая <sup>в</sup>
Мелпазин							16	59	24	74				Красновато-розовая <sup>в</sup>
Мепазинсульфоксид							40	61	16					Красная <sup>в</sup>
Метдилазин	15	26	12	12	9	45	74	58	24					Пурпурная <sup>в</sup>
Метоксипромазин													12	Желтая <sup>г</sup>
Отса	28	57	7	48	24	53	36	44	48				17	Желто-оранжевая <sup>г</sup>
Перазин	38	71		41	37	79	12	72	56				9	Красновато-розовая <sup>в</sup>
Перфеназин														—
Феноксиазин														Красновато-розовая <sup>в</sup>
Пипамазин													89—91	Красновато-розовая <sup>в</sup>
Прохлорперазин	10	31	6	24	8	55	70	27	32					Розовая <sup>в</sup>
Прохлорперазинсульфоксид													26	—
Прокетазин	19	45	6	53	25	44	13	28	13	88				Оранжево-розовая <sup>б</sup>
Промазин	16	31	12	11	11	50	62	38	37				37	Красновато-оранжевая <sup>г</sup>
Промегазинсульфоксид							17	46	15	70				Красновато-розовая <sup>в</sup>
Промегазин							70	59	22					Оранжевая <sup>в</sup>
Промегазинсульфоксид							22	57	30	78				Красновато-розовая <sup>в</sup>
Протипендил	16	21	11	11	8	44								Желтая <sup>б</sup>
Тиэтилперазин	14	50		23	13	61	97	67	70					Синяя <sup>б</sup>
Тиопропазат	64	79	49	65	53	81								Красновато-розовая <sup>в</sup>
Тиопропазин	24	39	14	24	15	64	97	65	20					—
Тиоридазин	3	13	1	9	3	33								Зеленовато-синяя <sup>в</sup>
Тиоридазинсульфоксид	18	33	9	34	12	51	69	33	40					Синяя <sup>б</sup>
Трифлуоперазин														Красновато-розовая <sup>в</sup>
Трифлуоперазинсульфоксид	3	11	2	17	3	31								—
Трифупромазин	36	50	48	22	22	72	95	79	40					Зеленовато-синяя <sup>в</sup>
Трифупромазинсульфоксид							26	48	24	93				Синяя <sup>б</sup>
Тримепразин							96	64	30					Оранжевая <sup>в</sup>

а А — трет-бутанол—1 н. гидроксид аммония (9 : 1) [49]; Б — *n*-пропанол—1 н. гидроксид аммония (22 : 3) [49]; В — диэтиловый эфир, насыщенный водой, взятой с избытком [49]; Г — метанол—вода (7 : 3) [49]; Д — *n*-пропанол—вода (17 : 3) [49]; Е — *n*-бутанол, насыщенный 1 н. гидроксидом аммония [49]; Ж — бензол—диоксан—гидроксид аммония (12 : 7 : 1), д.л. на пути элирования 10 см [50]; З — этанол—уксусная кислота—вода (5 : 3 : 2), 10 см [50]; И — метанол—бутанол (3 : 2), 10 см [50]; К — бензол—диоксан—гидроксид аммония (1 : 8 : 1), 10 см [50]; Л — бензол—ацетон—25 %-ный гидроксид аммония (10 : 2 : 1), 11,5 см [48]; М — метанол—ацетон—триэтиламин (1 : 1 : 0,087) [3].

б Окраска появляется под действием 40 %-ной серной кислоты [49].

в Окраска появляется под действием смеси 5,0 %-ная серная кислота—этанол (4 : 1) [50].

г Окраска появляется под действием 10 %-ного этанольного раствора серной кислоты [48].

слоях силикагеля, используя в качестве элюирующего растворителя смесь бензол—ацетон—25 %-ный гидроксид аммония (10:2:1) (табл. 26.2). Дополнительно со смесью бензол—этанол—25 %-ный гидроксид аммония (10:2:1) получены следующие величины  $R_f$ : перфеназин 0,49, Омса\* 0,64, перазин 0,81, промазин 0,92, либриум 0,64. Для обнаружения применяли различные реактивы, в том числе модифицированный реактив Драгендорфа (свежеприготовленная смесь 2 мл реагента Драгендорфа с 3 мл уксусной кислоты и 10 мл воды), под действием которого все соединения дают желто-оранжевые пятна. При опрыскивании 0,05 %-ным раствором перманганата калия все соединения обнаруживаются в виде оранжево-красных пятен на розовом фоне, только имипрамин дает зеленое пятно. Опрыскивание 10 %-ным этанольным раствором серной кислоты позволяет получить пятна разной окраски, однако пятно таракана появляется только через час после опрыскивания. Окраска, полученная при обработке пластинок 10 %-ным пероксидом водорода и 10 %-ным раствором азотной кислоты в этаноле, подобна получаемой при опрыскивании 10 %-ной серной кислотой.

Меллингер и Кеелер [49] анализировали ряд фенотиазиновых соединений методами хроматографии на бумаге, электрофореза на бумаге и тонкослойной хроматографии на силикагеле. Последний метод дал наилучшее разделение; авторы работы приводят величины  $R_f$  для шести различных элюирующих растворителей (табл. 26.2). Обнаруживающим реактивом служила 40 %-ная серная кислота. Положение пятен можно также определить, рассматривая пластинки в УФ-свете, лучше всего с длиной волны 263 нм.

Кочин и Дейли [50] разделили на силикагеле 26 фенотиазинов и родственных им соединений (табл. 26.2), применяя различные растворители. Предложенный ими метод предназначен для выделения и идентификации этих веществ из паталогоанатомических проб жидкостей и тканей. Для экстракции этих соединений из мочи, рН которой предварительно доводят до 9,0, применяют дихлорэтилен с добавкой 10 % изоамилового спирта. Для того чтобы перевести исследуемые вещества в этанольный раствор, сначала выпаривают раствор в дихлорэтилене под вакуумом. Если транквилизаторы экстрагируют из тканей, пробу ткани предварительно гомогенизируют и смешивают с 2—4 объемами изотонического раствора хлорида калия. Экстракцию ведут так же, как описано выше. Белки не мешают определению, поэтому осаждать их не нужно. После элюирования

\* 10-[3'-(4''β-оксиэтилпиперазин-1''-ил)пропил]-3-фторметилфенотиазин — Прим. перев.

одним из растворителей, указанных в табл. 26.2, пятна обнаруживают, опрыскивая смесью 50 %-ной серной кислоты с этанолом (4:1) или реактивом на основе иодоплатината калия (реактив Т-209). Для идентификации соединений с близкими величинами  $R_f$  более удобен первый реактив, так как пятна различных соединений окрашиваются в разные цвета. Кроме того, он позволяет отличить сульфоксидные производные от исходных соединений: производные реагируют с серной кислотой гораздо медленнее. Чтобы отличить сульфоксиды от фенотиазинов, можно также опрыскать пластинки 2 %-ным раствором хлорида железа(III). Этот реактив не действует на сульфоксиды, а с фенотиазинами образует окрашенные (от красных до фиолетовых) пятна.

Кофед и др. [51] идентифицировали фенотиазины с помощью реакции, проводимой непосредственно на слое адсорбента. Сначала фенотиазины элюировали на силикагеле, а затем их переводили в сульфоксиды, обрабатывая пятна 10—20 %-ным раствором пероксида водорода с последующей сушкой в токе горячего воздуха (60°C), и элюировали полученные сульфоксиды под прямым углом к направлению первого элюирования. Авторы работы привели величины  $R_f$  как для фенотиазинов, так и их сульфоксидов, а также максимумы спектрального поглощения элюированных сульфоксидов.

Зингалес [52] приводит величины  $R_f$  45 психотропных средств, полученные в 5 ТСХ-системах, а также указывает цветные реакции, полученные с 5 обнаруживающими реактивами и цвет пятен при дневном свете и при облучении УФ-светом. Краус и Дюмон [53] исследовали разделение 7 фенотиазинов на слоях с градиентом рН и установили, что оптимальная величина рН составляет примерно 8,5. Халшоф и Перрин [54] провели анализ 26 фенотиазиновых препаратов методом хроматографии с обращенными фазами. Адсорбентом служил кизельгур G, пропитанный олеиловым спиртом, элюентом—смесь метанол—вода с 30, 40 и 50 % метанола (масса/масса) при различных рН.

Элюируя пробу 5 %-ным раствором сульфата аммония, насыщенным изобутанолом, Нуарфализ и Грожан [55] хроматографировали ряд производных фенотиазина на слоях целлюлозы.

Феррари и Тот [56] хроматографировали на слоях силикагеля ряд лекарственных средств и полученных из мочи продуктов их метаболизма. Для разделения хлорпромазина и хлорпротиксена эти авторы использовали в качестве элюирующего растворителя смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (88:5:7), а для разделения имипрамина и амитриптилина—смесь тех же растворителей, но при соотношении 65:15:20.

Обнаруживающим реактивом при наблюдении пятен в видимом или УФ-свете служила концентрированная серная кислота.

Сено и др. [57] хроматографировали продукты окисления и разложения прохлорперазина, полученные при выдерживании растворов последнего на солнечном свете. На слоях силикагеля со смесью дихлорэтилен—метанол—гидроксид аммония (13:7:1) удалось разделить до 11 таких продуктов. Как для обнаружения, так и для количественной оценки полезно использовать прохлорперазин, меченный  $^{35}\text{S}$ . Количественные определения проводили, применяя сцинтилляционный счетчик. Метод авторадиограмм более чувствителен, чем опрыскивание химическими реагентами. Рузецкий и Хеннеберг [58] исследовали продукты разложения хлорпромазина. Эберхардт и др. [59, 60] изучали ряд производных фенотиазина, обнаруженных в моче. Они исследовали также действие реактивов, предназначенных для цветных реакций и применяемых для обнаружения соединений этого типа. При использовании смеси серной кислоты и этанола (1:9), 10 %-ного раствора фосфомолибденовой кислоты, хлорной кислоты ( $d=1,67$ ) или азотной кислоты можно обнаружить 1 мкг данного соединения. С применением 10 %-ного раствора хлорида железа(III) или раствора иода и иодида калия (0,25 г иода, 0,5 г иодида калия и 150 мл воды) чувствительность снижалась до 5 мкг. В табл. 26.3 даны величины  $R_f$ , полученные при элюировании смесью пиридин—петролейный эфир (50—70°C)—метанол (1:4,5:0,1), и указаны цветные реакции с различными обнаруживающими реагентами.

Турано и Тернер [61] разделили и определили количественно хлорпромазин и продукты его метаболизма методом двумерной ТСХ и прямой сканирующей микроденситометрии. Каул и др. [62] переводили метаболиты перед хроматографированием в дансилпроизводные. Флуориметрически удавалось обнаружить до 0,314 нг таких производных.

Тевари [63] исследовал смесь 23 психотропных лекарственных соединений методом электрофореза на слоях силикагеля при напряжении 500 В, используя буферный раствор тетрабората натрия.

Эйден и Штахель [64] нашли, что различные подвижные фазы наилучшее разделение дают на основном оксиде алюминия; в частности, на слоях этого адсорбента элюирование проводили смесями бензол—ацетон с различным соотношением компонентов. В табл. 26.4 сравниваются величины  $R_f$ , полученные в нескольких хроматографических системах.

Фиори и Мариго [65], а также Мариго [66, 67] опубликовали методику выделения и идентификации мепробамата в моче. Это соединение экстрагировали из щелочного раствора мочи (0,2 мл 1 н. гидроксида натрия, 10 мл эфира и 5 мл мочи).

Таблица 26.3

Величины  $R_f \times 100$  некоторых производных фенотиазина, полученные на силикагеле со смесью пиридин—петролейный эфир (50—70°C)—метанол (1:4,5:0,1) и их цветные реакции [60]<sup>a</sup>

Соединение	$R_f \times 100$	Цветные реакции						азотная кислота б
		серная кислота—этанол (1:9)	хлорная кислота	хлорид железа (III)	фосфомолибденовая кислота	иод—иодид калия б	Желто-коричневая→желтая	
Бутирилперазин	10	Желтая	Красно-коричневая	Желтая	Желтая	Желтая	Желтая	Желто-коричневая→желтая
Перазин	7	Красно-коричневая	Коричневая	Коричневая	Коричневая	"	"	Коричневая→желтая
Промазин	17	То же	Розовая	"	Красно-коричневая	Желтая→зеленая	Желтая→зеленая	Красно-коричневая→желтая
Прометазин	27	Розовая	Красная	Слабо красная	Розовая	То же	То же	Розовая→желтая
Хлорперфеназин	12	Красная	"	Красная	Красная	Желтая→оранжевая	Желтая	Красная→желтая
Мепазин	22	Красно-коричневая	Розовая	Коричневая	Красно-коричневая	Желтая	Желтая	Красно-коричневая→желтая
Хлорпромазин	38	Красная	Темно-красная	Красная	Красная	Желтая→зеленая	Желтая	Красная→темно-коричневая
Левомепромазин	47	Фиолетовая	Фиолетовая	Фиолетовая	Фиолетовая	Желтая	Желтая	Фиолетовая→желтая
Тиоридазин	30	Зеленая	Зеленая	Зеленая	Зеленая	"	"	Зеленая→красно-фиолетовая
Трифлупромазин	54	Коричневая	Коричневая	Слабо-коричневая	Слабо-коричневая	Желто-коричневая	Желто-коричневая	Светло-коричневая→желтая

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Editio Sanitor K G

<sup>б</sup> Стрелка показывает, что цвет пятна меняется

Таблица 26 4

Величины  $R_f \times 100$  фенотиазинов, полученные при хроматографировании на слоях оксида алюминия и целлюлозы [64]<sup>a</sup>

Фенотиазин	Нейтральный оксид алюминия Woelm, бензол—ацетон (95 5)	Основной оксид алюминия Woelm		Целлюлоза, вода—ацетон (70 30)
		бензол—ацетон (95 5)	бензол—ацетон (90 10)	
Трифторперазин	20	40	53	35
Падизал	0	0	0	55
Сельвигон	0	4	18	92
Хлорпромазин	31	64	85	46
Изотиазин	79	91	95	60
Комбелен	13	38	69	49
Рандолектил	10	25	55	37
Диэтазин	60	93	95	55
Изотипендил	24	57	78	65
Протипендил	13	45	70	58
Аминопромазин	13	42	63	60
Левомепромазин	21	83	90	62
Промазин	23	54	70	57
Прометазин	35	69	79	60

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Deutscher Apotheker-Verlag

После обработки 60 мг активного угля экстракт выпаривали, осадок растворяли в спирте и этот раствор наносили на хроматографическую пластинку. Адсорбентом служили закрепленные крахмалом слои кремневой кислоты, элюирующим растворителем смесь циклогексана и абсолютного этанола (17:3). Количественное определение мепробамата ( $R_f$  0,30) осуществляют следующим образом: пятно переносят в 1 мл дистиллированной воды и добавляют 1 мл 0,2 %-ного раствора гидрохинона в концентрированной серной кислоте, нагревают 20 мин на кипящей водяной бане и измеряют максимум поглощения при 420 нм. Беумлер и Риппштейн [68] нагревали пробу либриума 2 ч с 36 %-ной соляной кислотой, чтобы гидролизовать исходное соединение. В процессе гидролиза либриум образует 2-амино-5-хлорбензофенон, который можно экстрагировать из нейтрализованного гидролизата и хроматографировать

на силикагеле. С бензолом в качестве элюирующего растворителя он дает  $R_f$ , равное 0,5, либриум можно обнаружить в виде красного пятна после диазотирования и проведения реакции с  $\beta$ -нафтолом. Этим способом можно обнаружить малые, порядка 1 мкг, количества соединения. Продукт гидролиза можно определить количественно, элюируя его с пластинки бензолом и измеряя поглощение элюата при 383 нм.

Шютц и др. [69] разделили на силикагеле со смесью гептан—этанол—этилацетат—25 %-ный аммиак (18:2:14:1) пять транквилизаторов типа 5-фенил-1,4-бензодиазепина. Эти соединения переводили сначала в производные бензофенона опрыскиванием 37 %-ной соляной кислотой, а затем в свободные основания, подвергая их действию паров аммиака. После этого бензолом проводили второе элюирование под прямым углом к первому. Далее обрабатывали хроматограмму парами оксида азота(I) и опрыскивали реагентом Бреттона-Маршалла (реактив Т-89), в результате получали пурпурно-красные и фиолетовые пятна. Порог чувствительности составлял 0,02 мкг.

Обнаружению и количественному определению фенотиазин-нов посвящено несколько обзоров [70—72].

### Галлюциногены

Кларке [73] разделил смесь 8 галлюциногенных наркотиков на силикагеле G, используя как элюент раствор аммиака в метаноле (1,5:100). В этом растворителе два новых наркотика указанного типа, 3,4-метилendioксиамфетамин (MDA) и 3-метокси-4,5-метилendioксиамфетамин (MMDA), характеризуются  $R_f$  соответственно 0,50 и 0,55 [74]. Нивагучи и Иноуэ [75] выделили амиды лизергиновой и изолизергиновой кислот из семян ипомеи. Из трех использованных растворителей наилучшее разделение было достигнуто со смесью хлороформ—метанол (4:1). Указанные соединения обнаруживали реактивом Ван Урка (реактив Т-89); чувствительность обнаружения амида N, N-диэтил-D-лизергиновой кислоты (LSD) 0,05 мкг [76]. Эллистон и др. [77] использовали смесь морфолин—толуол (1:9) для разделения 19 эрганов и производных триптамина. При обработке пятен 5 %-ным (масса/объем) раствором 4-диметиламинобензальдегида в смеси (1:1) метанола и соляной кислоты чувствительность обнаружения LSD составляла  $4 \cdot 10^{-9}$  г. Дженест [78] применил прямой денситометрический метод для определения содержания амидов лизергиновой и изолизергиновой кислот, а также алкалоидов типа клавина в семенах ипомеи. Нивагучи и Иноуэ [79] определили содержание LSD *in situ* флуориметрически, а позднее осуществили [79a] сканирование хроматограмм с регистрацией профилей пиков и их площадей

на спектре для прямого денситометрического определения LSD и 2,5-диметокси-4-метиламфетамина (STP).

Корте и Сипер [80] исследовали полученные из экстрактов гашиша каннабидиоловую кислоту, каннабидиол, каннабинол и несколько изомеров тетрагидроканнабинола. Хроматографировали эти соединения на силикагеле, пропитанном 60 %-ным раствором (объем/объем) N,N-диметилформамида в тетрахлориде углерода. Пропитку проводили путем предварительного элюирования пропитывающей жидкостью в камере с насыщенной атмосферой. Чтобы добиться разделения, пробу элюировали циклогексаном трижды. Положения пятен разделенных соединений определяли, опрыскивая пластинки фенольным реагентом. Для количественного определения содержания этих соединений пластинки опрыскивали раствором красителя прочного синего В в 0,1 н. гидроксиде натрия, после чего элюировали пятна смесью уксусной кислоты и метанола (1:1) и измеряли поглощение элюата. Параллельно определяли поглощение контрольного раствора — холостого экстракта; точность определения составляла  $\pm 5\%$ . Каннабидиоловая кислота при этом не определялась.

Винсон и Гуимен [81] анализировали галлюциногены на слоях адсорбента, пропитанных триэтиламинем, элюировали пробу бензолом. Пропитанные триэтиламинем слои устойчивы, их можно хранить до хроматографирования в течение 10 недель. Тевари и др. [82] получили хорошее разделение на оксиде алюминия экстрактов конопли, элюируя их смесью бензол—хлороформ (1:1), т. е. не применяя пропитанных слоев. Сегельман [83] комбинировал гистохимическое исследование с анализом методом ТСХ с целью идентификации проб марихуаны. С помощью ТСХ можно установить, потребляет ли человек наркотики конопли [84, 85]. Для этого достаточно протереть пальцы его рук тампоном, смоченным хлороформом, а зубы тампоном, смоченным этанолом, и проанализировать полученные пробы методом ТСХ. Наибольшую чувствительность, порядка 1 нг, удается получить на слоях, пропитанных раствором нитрата серебра [84]. Чувствительность обнаружения тетрагидроканнабинола можно повысить, если анализировать не само соединение, а его производное. Юст и др. [86] анализировали дансилпроизводное на силикагеле, элюируя пробу смесью гептан—этилацетат (95:5) (тройное элюирование). Количественное определение проводили *in situ* флуориметрически. Предел чувствительности такого определения дансилпроизводного составляет около  $1 \cdot 10^{-12}$  моль. Винсон и др. [87] анализировали производное 2-*n*-хлорсульфобензил-3-фенилиндона [88]. Элюирование они проводили смесью метанола и воды (95:5) на листках силикагеля Bakerflex IB2 в насыщен-

ной атмосфере. Пятна соединений можно было наблюдать после опрыскивания раствором 8 г натрия в 100 мл метанола и 8 мл диметилсульфоксида и облучения длинноволновым УФ-светом. Чувствительность определения составляла 0,1 нг.

Паркер и Фиске [89], а также Меркус и др. [90] опубликовали обзоры работ, посвященных анализу веществ, входящих в состав конопли. Стерлингу [91] принадлежит обзор по методам анализа галлюциногенов.

### Антидепрессанты и возбуждающие средства

При расследовании ряда самоубийств выяснилось, что смерть наступила в результате отравления тофранилом, обычно применяемым как антидепрессант. В связи с этим Оберштег и Беумлер [92] занялись разработкой методики его определения. Как оказалось, в моче самоубийц можно обнаружить неизмененный тофранил, тогда как в моче пациентов, получивших нормальную дозу препарата, содержится только его метаболиты. При элюировании смесью метанол—ацетон—триэтанол-амин (1:1:0,03) на силикагеле получены следующие величины  $R_f$  тофранила и его метаболитов: тофранил 0,45; иминодибензил 0,9; 2-оксииминодибензил 0,9; диметиаминопропил-2-оксииминодибензил 0,40 и монометиламинопропилиминодибензил 0,23. Другие растворители, пригодные для хроматографирования тофранила, и соответствующие величины  $R_f$  указаны Меллингером и Келлером [49].

На силикагеле были хроматографированы следующие антидепрессанты: изокарбоксазид, фенелазин, ниаламид, изониазид, ипроклозид, имипрамин, дезипрамин, кломипрамин, тримепрамин, опипрамол, нортриптилин, амитриптилин, импрониазид и дибензепин [93—100]. В качестве элюирующих растворителей при этом использовались следующие смеси: хлороформ—метанол (1:1), бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1), безводный, не содержащий пероксидов эфир—ацетон—диэтиламин (90:10:1) и метанол, а в качестве обнаруживающих реактивов — реактивы Т-149, Т-111 и Т-131 и др.

Тюнел [100а] разработал метод выделения и обнаружения основных психотропных лекарственных средств, в том числе наркотиков алкалоидов и аминов, возбуждающе действующих на центральную нервную систему. Анализ таких соединений Тюнел рекомендует проводить методом двумерной ТСХ сначала со смесью метанол—аммиак (49:1), а затем с хлороформом, насыщенным аммиаком. Таким способом были выделены 29 соединений.

В гл. XV, разд. 2 «Пуриновые алкалоиды» (см. т. 1), приведены данные определения возбуждающих средств, таких, как кофеин и теофиллин.

Таблица 26 5

Величины  $R_f \times 100$  противогистаминных средств, полученные в различных хроматографических системах (длина пути элюирования 10 см)<sup>а</sup>

Соединение	Силикагель			Оксид алюминия
	бензол—диоксид азота—гидроксида аммония (12:7:1)	этанол—уксусная кислота—вода (5:3:2)	метанол—бутанол (3:2)	бутанол—бутиловый эфир—уксусная кислота (4:8:1)
Антазолин (антистин)	31	72	40	38
Бромдифенгидрамин (амбодрил)	86	80	33	63
Бромфенирамин (диметан)	42	47 <sup>б</sup>	16	48
Карбиноксамин (клинстин)	33	40 <sup>б</sup>	17	63
Хлорциклизин (дипарален)	90	68	40	49
Хлоротен (тагатен)	70	56 <sup>б</sup>	29	66
Хлорфенирамин (хлортриметон)	40	41 <sup>б</sup>	20	52
Дифенгидрамин (бенадрил)	91	61	25	53
Доксиламин (декаприн)	52	38 <sup>б</sup>	17	60
Гидроксизин (атаракс)	27	70	62	84
Метапирин (тенилпиримин)	83	52 <sup>б</sup>	30	56
Фениндамин (теофорин)	90	67	48	65
Фенирамин (триметон)	68	38 <sup>б</sup>	19	63
Пириламин (неоантерган)	82	43 <sup>б</sup>	27	56
Пирробутамин (пиронил)	84	82	32	78
Тонзиламин (неогетрамин)	65	57	32	59
Трипеленнамин (пирибензамин)	92	48 <sup>б</sup>	23	62
Триполидин (актидил)	40	48 <sup>б</sup>	26	81

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Williams and Wilkins Co.

<sup>б</sup> Образование «хвостов».

#### 4. ПРОТИВОГИСТАМИННЫЕ СРЕДСТВА

Кочин и Дейли [50] определили величины  $R_f$  ряда противогистаминных средств на адсорбционных слоях как силикагеля, так и оксида алюминия (табл. 26.5). Эти величины  $R_f$  получены после экстракции указанных веществ из проб мочи, к которым были добавлены чистые соединения. Положения пятен этих соединений можно определить, обрабатывая пластинку реактивом на основе идоплатината калия. В разделе, посвященном транквилизаторам, этот реактив уже упоминался. Файк и Саншайн [101] использовали три хроматографические системы для выделения 25 противогистаминных средств, а именно: силикагель со смесью циклогексан—бензол—диэтиламин (75:15:10); силикагель, обработанный 0,1 М раствором гидроксида натрия, и метанол; силикагель, обработанный 0,1 М раствором бисульфата калия, также с метанолом. Эти авторы применяли многократное элюирование и разделили практически все вещества, за исключением трех пар: буклизин—меклизин, фенирамин—хлорфенирамин и дифенгидрамин—бромдифенгидрамин. Однако последние две пары можно разделить на оксиде алюминия (см. табл. 26.5). Обнаруживали пятна реактивами Дрангендорфа (реактив Т-112) и Манделина (реактив Т-21). Бунен [102] использовал метод двумерной хроматографии на силикагеле, проводя элюирование сначала смесью этанол—уксусная кислота—вода (5:3:2), а затем метанолом.

#### 5. БОЛЕУТОЛЯЮЩИЕ (АНАЛЬГЕТИКИ) И ЖАРОПОНИЖАЮЩИЕ СРЕДСТВА

Большинство болеутоляющих алкалоидов рассматривается в гл. «Алкалоиды». Мюле [103, 104] получил величины  $R_f$  большого числа наркотических анальгетиков на слоях силикагеля и целлюлозы с 7 различными элюирующими растворителями (табл. 26.6). Эти соединения анализировали методом двумерной ТСХ с элюированием смесью метанол—*n*-бутанол—бензол—вода (12:3:2:3) в первом направлении и одной из смесей с этанолом или третичным амиловым спиртом—во втором. Обнаружение проводили с помощью реактивов на основе идоплатината. Кочин и Дейли [105] также разделили группу из 16 болеутоляющих алкалоидов на слоях силикагеля и оксида алюминия. Они привели величины  $R_f$  для шести различных комбинаций растворитель—адсорбент.

Видиц [106] использовал силикагель G и 0,1 н. метанольный раствор аммиака для отделения анальгетика джетриум (декстроморамида) от других болеутоляющих средств, а также от тикарды—средства от кашля. Видиц получил следующие

Величины  $R_f \times 100$  наркотических болеутоляющих средств, полученные в различных хроматографических системах (длина пути элюирования 10 см) при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$

Болеутоляющее средство	Силикагель G			Целлюлоза б			Силикагель G		
	этанол— пирдин— диоксан— вода (10 : 4 : 5 : 1)	этанол— уксусная кислота— вода (6 : 3 : 1)	этанол—диок- сан—бензол— гидроксид аммония (1 : 8 : 10 : 1)	метанол— и-бута- нол—бен- зол—вода (12 : 3 : 2 : 3)	метанол— и-бута- нол—бен- зол—вода (12 : 3 : 2 : 3)	трет.-амло- вый спирт— и-бутило- вый эфир— вода (80 : 7 : 13)	трет.-амло- вый спирт— и-бутило- вый эфир— вода (80 : 7 : 13)	и-бута- нол—ук- сусная кислота— вода (4 : 1 : 2)	и-бутанол— концентриро- ванная HCl (9 : 1), насы- щенная парама вода
	Иминоэтанолпрофу- раны								
Морфин	29	27	11	21	86	85	7	54	34
Норморфин	8	48	4	7	48	25	S <sup>в</sup>	66	62
Кодеин	30	29	39	25	86	91	8	53	30
Норкодеин	12	50	13	9	59	56	6	63	49
Героин	37	35	76	35	90	65	15	61	32
Наморфин	71	55	35	67	88	96	25	59	41
Метилгидромор- фин	16	24	25	15	76	92	S	45	26
Дигидроморфин	11	21	17	13	65	85	S	41	25
Этилморфин	33	25	46	27	84	96	8	53	33
Дигидрооксимор- фин	46	29	34	24	63	81	10	45	28
Дигидроморфин	15	21	10	10	67	73	S	43	29
Дигидрокодеин	17	25	41	19	76	94	S	42	23
Диоксикодейн	46	24	87	29			16	32	34
6-Моноацетилмор- фин	38	40	64	29			19	37	37
Иминоэтанолпрофураны									
1-3-Окси-N-метил- морфинан	11	47	80	10			7	51	60
1-3-Оксиморфинан	5	68	19	10			8	72	80
1-3-Метокси-N-метил- морфинан	13	43	91	8			7	55	59
1-3-Метокси-N-аллил- морфинан	7	65	38	S			S	66	81
Диарилалконамины	65	70	98	41			44	64	73
dl-Металон	34	59	99	17			17	55	62
dl-Алетилметалол	64	60	99	40			38	52	62
d-Пропоксифен	73	68	97	54			56	53	61
Арилпиперидины									
Петидин	42	41	97	36			20	46	44
Норпетидин	12	65	51	10			11	58	63
Кетобемидол	31	39	47	24			12	42	40
dl-Альфанолдин	39	40	93	34			20	42	40
Пиминодин	88	73	99	85			76	69	58
Бензоморфаны									
dl-2'-Окси-5,9-димер- тил-2-фенетил-6,7- бензоморфан	88	87	97	82			70	76	77
1,2'-Окси-2,5,9-три- метил-6,7-бензо- морфан	12	36	56	8			5	43	51
2'-Окси-5,9-диметил- 2-(3,3-диметилал- лил)-6,7-бензомор- фан	73	81	96	25			34	65	77
2'-Окси-5,9-диметил- 2-циклопропил- метил-6,7-бензо- морфан	45	71	92	15			16	55	67

<sup>а</sup> По данным С. Ж. Мюле; приведено с разрешения автора и Amer. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Слон целлюлозы, приготовленные смешением 15 г целлюлозы MN 300 G и 90 мл 0,1 M фосфатного буферного рас-  
твора с pH 8,0.

<sup>в</sup> На хроматограмме образуются прожилки



величины  $R_f$ : джетриум 0,85, ромилар (гидробромид *d*-3-метокси-*N*-метилморфана) 0,26, поламидон (гидрохлорид *dl*-метадона) 0,42 и тикарда (6-диметиламино-4,4-дифенилтригексан) 0,59.

Шаршунова и Шварц [107] определили в 10 различных растворителях на незакрепленных слоях оксида алюминия величины  $R_f$  8 соединений, оказывающих жаропонижающее и болеутоляющее действие, а именно: ацетилсалициловой кислоты, амидопирин, антипирина, кодеина, кофеина, хинина, папаверина и фенацетина. Беумлер и Рипштейн [21] указали следующие интервалы величин  $R_f$ , полученные при элюировании смесью метанол—ацетон—триэтаноламин (1:1:0,03) на силикагеле G: антипирин 0,70—0,72, дипирин 0,74—0,76 и изопропилантипирин 0,83—0,85.

Генсхирт [108] разделил на силикагеле кофеин, амидопирин, фенацетин и бензиловый эфир миндальной кислоты. Чтобы провести количественное определение, он элюировал разделенные соединения с пластинки и определял поглощение элюата. Содержание эфира миндальной кислоты можно определить только полуколичественно. Фромида и др. [109] использовали ультрафиолетовую отражательную спектроскопию для количественного определения аспирина и салициловой кислоты. Фува и др. [110] анализировали методом многостадийного хроматографирования лекарственные препараты японской фармакопей VII, в состав которых входят жаропонижающие средства. Эти авторы выделили и идентифицировали гидрохлорид дифенгидрамина, гидрохлорид хинина, сульпирин, кофеин, амидопирин, пирабитал, этилкарбонат хинина, фенацетин и ацетанилид.

Эммерсон и Андерсон [111] применяли слои силикагеля в комбинации с нейтральными растворителями, помещая в хроматографическую камеру стаканчик с 28 %-ным раствором аммиака. В таких условиях аналгетики можно разделять как в виде свободных оснований, так и в виде солей. Наилучшие результаты получены при использовании в качестве подвижной фазы бензола или дихлорметана.

Томпсон и Джонсон [112] привели величины  $R_f$  29 болеутоляющих, жаропонижающих и противовоспалительных средств, полученные на флуоресцирующем силикагеле со смесью циклогексан—ацетон—уксусная кислота (40:50:1). Порог чувствительности при облучении хроматограмм коротковолновым УФ-светом лежит в пределах от 1 до 5 мкг. Радулович и др. [113, 114] разделяли смеси обезболивающих и жаропонижающих средств на слоях талька, элюируя пробы смесью циклогексан—ацетон—хлороформ (7:2:1), бензолом, толуолом и различными смесями циклогексан—хлороформ в сочетании

с 1,4-диоксаном, тетрагидрофураном, этилацетатом или метилэтилкетонном.

Хсю и др. [115] хроматографировали следующие жаропонижающие средства: салициловую кислоту, салициламид, ацетилсалициловую кислоту, оксифенбутазон, антипирин, ацетанилид, аминопирин, фенацетин и индометацин. Адсорбентом служил полиамид, элюентами — четыре растворителя, в том числе смеси хлороформ—бензол — 90 %-ная муравьиная кислота (50:10:1) и циклогексан—хлороформ—уксусная кислота (4:5:1). Чжанг и Чжанг [116] анализировали 8 жаропонижающих средств на слоях смеси полиамид—силикагель (1:5), элюируя пробы смесью хлороформ—циклогексан—уксусная кислота (40:60:1) и той же смесью с добавлением 10 частей диоксана.

Унтерхальт [117] разделял на силикагеле противовоспалительные средства бутазолидин, тандерил, антуран, амуно, паркемед и арлеф, используя смеси циклогексан—хлороформ—метанол—уксусная кислота (12:6:1:1) или метанол—уксусная кислота—диэтиловый эфир—бензол (1:18:60:120). Пеллерен и Маншерон [118] хроматографировали на силикагеле кофеин, метилацетанилид, амидопирин, фенацетин, хинин и антипирин, элюируя пробы смесями бензол—эфир—уксусная кислота—метанол (120:120:18:1), хлороформ—этанол (99:1) и пиридин—хлороформ—циклогексан (1:12:4). Для обнаружения пятен применяли реагенты Драгендорфа (Т-111) и Миллона (Т-166).

Антиревматические лекарственные препараты—фенацетин, феназон, аминофеназон, нораминофеназон, фенилбутазон и салициламид — авторы работы [119] разделяли на силикагеле смесью бутилацетат—хлороформ — 85 %-ная муравьиная кислота (6:4:2). Для обнаружения пятен проводили опрыскивание сначала 5 %-ным раствором хлорида железа(III), а затем 1 %-ным спиртовым раствором *o*-фенантролина.

## 6. СИМПАТОМИМЕТИКИ

В табл. 3.5 (т. 1, гл. 3) уже были даны значения  $R_f$  группы производных адреналина, полученные с четырьмя различными растворителями на слоях силикагеля, обработанных и не обработанных буферным раствором. Вальди [120] переводил адреналин в триацетилпроизводное прежде, чем проводить хроматографию на слоях силикагеля G, применяя в качестве растворителя смесь хлороформа и метанола (9:1). Кроме того, для разделения можно использовать смесь циклогексан—хлороформ—метанол—уксусная кислота (3:5:1:1); с этой смесью получены следующие величины  $R_f$  триацетилпроизводных: адреналин 0,36, норадреналин 0,26 и эфедрин 0,51. Для обнаружения

разделенных соединений можно опрыскивать пластины смесью ванилин—серная кислота или сначала 40 %-ной фосфорной кислотой, а затем 5 %-ной фосфомолибденовой кислотой. В последнем случае пластинки дважды — после опрыскивания фосфорной кислотой и после окончательного опрыскивания фосфомолибденовой кислотой — сушат при 110°C. Сравнивая размер пятна с размерами пятен, полученных при известных концентрациях соединения, можно определить содержание адреналина.

Бекет и Чоулис [121, 122] показали, что амины, входящие в группу симпатомиметиков, дают по два пятна при хроматографировании смесью бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) на тонких слоях целлюлозы в присутствии трихлоруксусной кислоты. На слоях силикагеля не происходит образования таких кратных пятен, не образуются они и на слоях целлюлозы, если эти слои предварительно обработать диазометаном, т. е. этерифицировать карбоксильные группы. Чоулис [123] разделял адреналин, норадреналин и допамин на слоях целлюлозы, элюируя смесью фенол—вода (4:1). Вахиди и Санкар [124] применяли для разделения адреналина, норадреналина, 3-О-метиладреналина, 3,4-диоксифениланилина (допа), допамина и тирамина на слоях целлюлозы смесь этилацетат—уксусная кислота—вода—бутанол (3:1:3:2).

Некоторые авторы анализировали симпатомиметики на слоях полиамида. В этом случае хорошие результаты получены со смесями изобутанол—уксусная кислота—циклогексан (80:7:10) [125] и бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1) [126]. Пятна соединений обнаруживали реактивами Т-114 или Т-249.

Чоулис и Кери [127] использовали для количественного определения при хроматографировании на целлюлозе смесь бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5), содержащую добавку метабисульфита натрия в качестве окислителя. 3,4-Диоксифениланилин, допамин и эфедрин обнаруживали нингидрином, амфетамин—диазотированным нитроанилином, а другие амины — реактивом Т-200. Спектрофотометрические измерения поглощения элюата дают погрешность  $\pm 3\%$ , а денситометрия вместе с измерением площади пятен  $\pm 5\%$ .

Розер и Точки [128] испытали 9 диазониевых реактивов, предназначенных для обнаружения катехоламинов, и установили, что самый лучший из них — тетрафторборат *n*-нитробензолдиазония (реактив Т-181). Чувствительность обнаружения этим реактивом составляет от 0,01 до 0,05 мкг. Ван Хооф и Хейндрикс [129] перед хроматографированием на силикагеле смесью этилацетат—циклогексан (3:2 или 2:3) связывали амфетамин и другие симпатомиметики 4-хлор-7-нитробензо-2,1,3-

оксадиазолом. После хроматографирования эти авторы измеряли *in situ* интенсивность флуоресценции при 523 нм, возбужденной облучением с длиной волны 482 нм. Визуальное наблюдение можно проводить при облучении длинноволновым (350 нм) УФ-светом. Порог чувствительности обнаружения при этом равен 1 нг. Этим способом нельзя обнаружить соединения, не содержащие первичных или вторичных алкиламинных групп.

Ло и др. [130] переводили амфетамин и метамфетамин в дансилпроизводные, которые затем хроматографировали на полиамиде смесями муравьиная кислота—вода (1,5:100) или вода—муравьиная кислота—*n*-бутанол—этанол (150:3:4:93). Двумерное элюирование этими двумя растворителями дает лучшие результаты. Количественно путем сканирования флуоресценции *in situ* можно определить от 1—2 нг этих веществ, а обнаружить их присутствие можно при содержании всего 0,3—0,5 нг.

## 7. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ МЕСТНОЙ АНАСТЕЗИИ

Шаршунова [131] исследовала хроматографическое разделение 15 лекарственных веществ, предназначенных для местной анестезии, в 11 различных растворителях на незакрепленных слоях оксида алюминия с активностью III (табл. 26.7). Положение пятен этих соединений определяли опрыскиванием реактивом Драгендорфа, модифицированным Мунье, или подкисленным раствором иод—иодид калия.

Гувен и Хинкал [132] разделили *n*-аминобензойную кислоту, новокаин, пантокаин и бензокаин методом двумерной ТСХ на силикагеле G смесью хлороформ—ацетон—вода—метанол (2:4:1:4 и 2:2:1:4). Для обнаружения пятен применяли реактив Драгендорфа (Т-112). При этом были получены следующие величины  $R_f$ : 0,82, 0,77; 0,46, 0,42; 0,58, 0,59 и 0,92, 0,94 соответственно. Фрезен [133] анализировал бензокаин, прокаин, цинкокаин и паретоксикаин методом хроматографии с обращенными фазами на слоях целлюлозы MN 300, пропитанной 10 %-ным раствором олеилового спирта, применяя в качестве элюирующих растворителей 0,5 М буферные растворы моно- и бифосфата натрия (рН от 0,4 до 11). Редер и др. [134] использовали азеотропные смеси растворителей для разделения 10 анестезирующих средств, а де Зееув [135] применил метод ТСХ с программированием состава паровой фазы (ТСХ-ПП) для разделения смеси из семи компонентов. Мессершмидт [136] хроматографировал дансилпроизводные эфиров *n*-аминобензойной кислоты, применяемые как анестезирующие средства.

Величины  $R_f \times 100$  <sup>а</sup> некоторых анестезирующих веществ, полученные на незакрепленных слоях оксида алюминия в различных растворителях [131] <sup>б</sup>

Анестезирующее вещество	Бен- зол	Бензол—этанол				Хлоро- форм	Хлоро- форм— этанол (99:1)	Хлоро- форм— бутанол (98:2)	Хлоро- форм— ацетон (1:1)	Эфир	Эфир— петролей- ный эфир (1:1)		
		95:5		90:10								80:20	
		98	2	95	5							90	10
Гидрохлорид прокаина	0	14	31	52	65	27	34	43	60	54	11		
Гидрохлорид цинхокаина	10	19	46	65	75	42	51	47	75	61	20		
Гидрохлорид кокаина	17	34	65	75	82	57	67	60	80	70	30		
Гидрохлорид тетракаина	8	15	40	63	72	40	43	56	59	58	20		
Этоформ (бензокаин)	18	25	48			53	52	62	70	75	31		
Тутокаин	10	16	43	62	71	45	41	57	60	55	22		
Диметоксаин (ларокаин)	12	18	37	54	70	40	50	45	79	68	24		
Ортоформ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$\gamma$ -Эукаин	14	16	28	53	72	41	44	45	51	30	21		
Диокаин	10	17	55	67	80	35	51	52	81	80	24		
Лидокаин (кслокаин)	10	17	50	56	78	52	62	56	81	65	22		
Фенакоин (голокаин)	6	24	52	60	77	37	37	55	77	70	27		
Гостоксаин	10	17	26	42	68	27					5		
Тримексаин (мезокаин)	5	16	35	57	74	50	64	55	80	62	23		
Декстроксаин (псикаин)	8	18	46	65	78	55	64	57	78	63	25		

<sup>а</sup> Среднее шести определений

<sup>б</sup> С разрешения автора и VEB Verlag Volk und Gesundheit.

## 8. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СУЛЬФОПРЕПАРАТЫ

Хроматографическому анализу этих важных соединений посвящен ряд статей. Рейш и др. [137] разделили 10 таких соединений на силикагеле G, элюируя пробы смесями *n*-бутанол—метанол—диэтиламин (9:1:1) и *n*-бутанол—метанол—ацетон—диэтиламин (9:1:1:1). Разделение проводили в камере с насыщенной атмосферой, а для обнаружения применяли диазотирование или опрыскивание реагентом Эрлиха. Уоллиш и др. [138] анализировал на силикагеле смесь четырех сульфаниламидов и сульфаниловой кислоты, пользуясь смесью хлороформ—гептан—этанол (1:1:1). Образцы смеси (~1 мкг) наносили на пластинки в виде раствора в ацетоне. Обнаруживали пятна после разделения опрыскиванием 0,1 %-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в этаноле, содержащим 1 % концентрированной соляной кислоты. Бицан-Фиштер и Кайганович [139] применяли эфир и смесь хлороформ—метанол (10:1) для разделения на силикагеле 12 сульфаниламидов; хроматографирование велось в насыщенной атмосфере. Чувствительность обнаружения пятен диазотирующим реактивом или *n*-диметиламинобензальдегидом достигала 0,25 мкг. Авторы работы приводят величины  $R_f$  ряда соединений.

Бицан-Фиштер и Кайганович [140] разработали также количественный метод анализа фармацевтических препаратов. Сульфопрепараты экстрагируют из таблетки 50 мл смеси, приготовленной из 50 мл 70 %-ного этанола и 2 мл 25 %-ного гидроксида аммония. Экстракцию ведут в течение 15 мин, после чего экстракт осветляют центрифугированием и наносят на силикагель G три аликвотные пробы экстракта (по 9 мкл каждая) и стандартные растворы. Таким же способом экстрагируют суспензии, причем, чтобы получить 50 мл экстракта, берут такое количество суспензии, в котором содержалось бы 500 мл сульфониамида. Если анализируются свечи, навеску, содержащую 250 мг сульфониамида, встряхивают со 100 мл эфира, 10 мл воды и 2 мл 25 %-ного раствора гидроксида аммония. После того как растворители расслоятся, водный слой отделяют. Эфирный слой несколько раз промывают водой, добавляют промывную воду к водному слою и доводят его конечный объем до 25 мл. Состав элюирующего растворителя зависит от природы изучаемой смеси. Хорошее разделение сульфатиазола, сульфамеразина и сульфадиазина получают при элюировании смесью хлороформ—метанол (9:1), а смеси сульфациетамид—сульфамеразин—сульфаметазин или сульфадиазин—сульфамеразин—сульфаметазин лучше всего элюировать смесью хлороформ—метанол—25 %-ный гидроксид аммония (90:15:2,4). Наилучшим элюирующим растворителем для разделения

Величины  $R_f \times 100$  сульфонамидов, полученные в различных хроматографических системах

Сульфонамид	Оксид алюминия G [144]		Силикагель G [144]		Полиамид [144]		Связкагель G [143]
	этилацетат—метанол—25 %-ный гидроксид аммония (17 3 3)		этилацетат—метанол—25 %-ный гидроксид аммония (17 6 5)		метилэтилобутил-кетон—ацетон—25 %-ный гидроксид аммония (5 20 1)		
	этилацетат—метанол—25 %-ный гидроксид аммония (1 4 1)		этилацетат—метанол—25 %-ный гидроксид аммония (17 3 1)		метилэтилобутил-кетон—ацетон—25 %-ный гидроксид аммония (5 20 1)		
Сульфацетамид	19	38	97	38	12	7	31
Сульфаниламид	96	79	97	79	84	73	43
Сульфатиазол	42	57	80	57	18	12	41
Сульфапиридин	28	55	77	55	84	69	37
Сульфатиомочевина	28	49	60	49	10	5	34
Сульфатуанидин	78	64	50	64	47	33	15
N,N-Диметилacroзилсульфаниламид	38	54	74	54	22	12	
Сульфадiazин	19	38	49	38	30	13	39
Сульфамеразин	25	45	59	45	49	25	44
Сульфаметазин	35	51	69	51	67	46	52
Сульфазилтиодиазол	96	79	97	79	85	74	
Сульфазилтиодиазол	41	61	80	61	14	13	
Малеилсульфаниламид	34	61	81	61	13	8	
Сукцинилсульфаниламид (натриевая соль)	12	6	6	6	4	6	
N <sup>1</sup> -Бензолсульфаниламид	50	59	85	59	10	7	
Фталилсульфацетамид	6	33	26	33	0	0	
Фталилсульфатазол	6	44	50	44	1	0	
4-Гомосульфаниламидная соль 1-сульфанилил-2-тиомочевины	28	49	60	49	10	5	
<hr/>							
N <sup>1</sup> -3,4-Диметилбензолсульфаниламид	85	61	86	61	10	8	40
Сульфизомидин	39	48	74	48	20	17	19
N <sup>4</sup> -Карбэтоксисульфозилтиодиазол	63	61	88	61	24	23	
Сульфизоксазол	34	53	77	53	8	7	51
Сульфаниламидо-2-фенилпиразол	56	57	86	57	13	9	77
N <sup>1</sup> -Изопропоксисульфаниламид	58	61	92	61	18	14	
Сульфаниламидо-4,5-диметоксазол		58 <sup>a</sup>	47 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	25	17	
Сульфатазолформальдегид		50	63	50	0	6	70
2-Сульфаниламидо-3-метоксипиразин	34				25	17	
N <sup>1</sup> -Ацетил-2-сульфаниламидо-3-метоксипиразин	T		76	54	97	T	72
Сульфа-4,6-диметоксипиримидин	46	57	85	57	58	45	
2,4-Диметил-6-сульфаниламидо-1,3-дiazин	45	57	81	57	57	25	46
2-Сульфаниламидо-5-метилпиримидин	26	45	59	45	50	26	56
2-Сульфаниламидо-5-метоксидiazин	25	45	60	45	35	35	
3-Сульфаниламидо-6-метоксипиридин	36	50	73	50	47	39	61
N <sup>1</sup> -Ацетил-3-сульфаниламидо-6-метоксипиридин	a	54	70	54	97	T	24
Сульфонамидодиметокситриазин							25
Сульфа-5-метилтиодиазол							33
Сульфатпроксиллин							47
4'-Сульфанил-2,4-диаминоазобензол ·HCl							67
Сульфадиметоксин							80
5-Метил-3 сульфаниламидониксоксазол							82
Диметилакрилсульфонилламид							

<sup>a</sup> Наблюдается образование «хвостов»

сульфатиазола, сульфаметазина и сульфамеразина оказался эфир. Обнаружение пятен проводят опрыскиванием сначала свежеприготовленным 0,1 %-ным раствором нитрита натрия, а затем 0,1 %-ным раствором гидрохлорида *N*-(1-нафтил) этилендиамина. Обнаруженные пятна соскабливают в 25-миллилитровую колбу и встряхивают 20 мин с 5 мл 0,1 н. соляной кислоты. Затем экстракт осветляют центрифугированием и аликвотную долю его (3 мл) помещают в 25-миллилитровую колбу вместе с 1 мл нитрита натрия. Через 3 мин туда добавляют 1 мл 0,5 %-ного раствора сульфамата аммония и еще через 2 мин 1 мл 0,1 %-ного раствора *N*-(1-нафтил)этилендиамина. Затем после 15-минутного отстаивания измеряют интенсивность окраски при длине волны 545 нм. Содержание анализируемых веществ определяют, сравнивая интенсивность окраски исследуемых и стандартных образцов.

Кляйн и Кхо [141] изучали ряд фармацевтических препаратов, содержащих в большинстве случаев от двух до четырех сульфаниламидов. Пробы экстрагировали ацетоном так, чтобы в 50 мл ацетонового экстракта содержалось около 10 мг того сульфонида, концентрация которого в препарате наибольшая. При исследовании проб суспензий, содержащих мешающие примеси, до экстракции ацетоном пробу сначала смешивали с 1 мл дистиллированной воды. Хроматографические пластинки элюировали на расстояние 15 см растворителем, представлявшим собой смесь хлороформ—этанол—гептан (1:1:1) с примесью от 1,0 до 1,8 % воды в зависимости от характера разделяемой сульфонида смеси. После разделения соединения диазотировали и затем проводили реакцию с 0,1 %-ным раствором дигидрохлорида *N*-(1-нафтил)этилендиамина. Хо и Кляйн [142] применяли также двустадийное хроматографирование  $N^4$ -замещенных сульфонидами. Пластинки с силикагелем сначала элюировали на расстояние 5 см смесью метанол—этанол (1:1), а затем после 5-минутной сушки при 100°C элюировали на расстояние 10 см смесью *n*-пропанол—0,05 н. соляная кислота (4:1) в камере, облицованной изнутри фильтровальной бумагой.

Карпичка [143] определил величины  $R_f$  большого числа сульфонидами (табл. 26.8) на слоях силикагеля при элюировании смесью хлороформ—петролейный эфир (60—80°C) — *n*-бутанол (1:1:1). Обнаружение пятен он проводил, опрыскивая хроматограмму 1 %-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в 5 %-ной соляной кислоте. Ван дер Венне и Т'Си-оббель [144] также исследовали большое число соединений этого класса методами хроматографии на бумаге и ТСХ на силикагеле G, оксиде алюминия G и полиамиде. Величины  $R_f$ , полученные последним методом, также приведены в табл. 26.8.

Биаги и др. [145] хроматографировали 20 соединений на слоях силикагеля и полиамида, элюируя пробы ацетатным буферным раствором вероната (рН 7,4) с добавкой различных количеств ацетона. Де Зееув [146] разделил 15 сульфонидами методом ТСХ с программированием состава паровой фазы (ТСХ-ПП). Лепри и др. [147] исследовали хроматографическое разделение сульфонидами на дауэксе 50-X4 ( $H^+$ ), AG1-X4 ( $CH_3COO^-$ ), микрокристаллической целлюлозе и целлексе D ( $ClO_4^-$ ). Электрофоретическое разделение они проводили также на Ag1-X4 ( $CH_3COO^-$ ), силикагеле и смеси этих двух адсорбентов. Валаш и Агарвал [148] рекомендуют для обнаружения сульфонидами насыщенный раствор ацетата меди(II) в метаноле. Сигель и др. [149] пользовались следующей методикой определения содержания сульфонидами. По окончании элюирования пластинку со слоем силикагеля высушивают, а затем погружают в 0,5 %-ный раствор флуорескамина в ацетоне, вновь высушивают и погружают в 0,5 %-ный раствор триэтанолamina в хлороформе. После этого снимают спектр флуоресценции при длинах волн выше 400 нм, возбуждая флуоресценцию облучением светом с длиной волны 290 нм, и измеряют площади пиков. Этим способом удалось обнаружить в мышечных тканях до 0,2 нг сульфадиазина.

## 9. СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ

Соединения этой группы получают из лекарственных растений и применяют для стимулирования сердечной деятельности. Наиболее широко известны гликозиды наперстянки (*Digitalis*). Поскольку соединения этой группы широко используются как лекарственные средства, их исследованию посвящено большое число работ. Чеше и др. [150] первыми применили ТСХ для разделения этой важной группы соединений и определили относительные величины  $R_f$  10 веществ. Разделение проводили на высушенных при 130°C слоях силикагеля G с этилацетатом в качестве элюирующего растворителя. Подобные же величины  $R_f$  получены при элюировании смесью диизопропилового эфира с ацетоном (3:1). Обнаруживали анализируемые соединения, опрыскивая пластинки смесью хлорсульфоновой и уксусной кислот (1:2) и затем нагревая их до 130°C. При такой обработке на пластинке появляются зеленые пятна, которые дают коричнево-фиолетовую флуоресценцию при УФ-облучении.

Райхельт и Питра [151, 152] исследовали разделение 29 сердечных гликозидов в различных хроматографических системах. Одна из таких систем: адсорбент — слой силикагеля, дезактивированного 25 % воды, элюирующий растворитель — смесь бензола с этанолом в соотношении 3:1. Эти же авторы применяли

силикагель, на 50 % дезактивированный 43 %-ной уксусной кислотой, и силикагель, пропитанный раствором буры, с тем чтобы увеличить степень удерживания соединений с *цис*-вицинальной гликольной группировкой в молекуле. Брекмен и др. [153] разделяли на силикагеле гликозиды, полученные из *Digitalis purpurea*, элюируя пробу смесями метилхлорид—метанол—формамид (80:19:1) и метилэтилкетон—метилхлорид—бутанол—диметилформамид (40:40:19:1). Зурковская и др. [154, 155], а также Фоконне и Вальдесбуль [156] исследовали гликозиды наперстянки также с помощью ТСХ.

Съехольм [157] разделил 28 альгиконов гликозидов наперстянки методом двумерного элюирования на слоях силикагеля, высушенных в течение 30 мин при 110°C. Для первого элюирования он использовал смесь этилацетат—метанол—вода (16:1:1), а для второго — смесь хлороформ—пиридина (6:1). Чтобы удалить растворители, полученные хроматограммы нагревали при 90—100°C до полного исчезновения запаха пиридина. Для разделения гликозидов применяли в качестве растворителя также смесь метилэтилкетон—хлороформ—формамид (5:2:1). После испытания нескольких окрашивающих реагентов лучшим был признан реактив Т-25, в состав которого входят *n*-анисовый альдегид и хлорная кислота. Под действием этого реактива пятна различных соединений окрашиваются в характерные цвета; чувствительность обнаружения составляет 0,1—0,2 мкг в видимом свете и 0,02 мкг при УФ-облучении. Относительные величины  $R_f$  этой группы соединений приведены в табл. 26.9. Среди других обнаруживающих реактивов испытаны также реактивы Т-263 и Т-32.

Пекич [158] разделял гликозиды наперстянки на тальке, пропитанном формамидом (0,134—0,2 г на 1 г адсорбента), используя в качестве растворителя насыщенную формамидом смесь ксилол—метилэтилкетон (1:1). Бойсио [159] исследовал разделение на силикагеле агликонов сердечных гликозидов с 27 различными растворителями. Он составил таблицу полученных величин  $R_f$ . Изучая соотношение между структурой и хроматографическими характеристиками, Новер и др. [160] привели полученные с 4 различными растворителями величины  $R_f$  и  $R_M$  169 лекарственных веществ, возбуждающих сердечную деятельность, а также большого числа перацетатов этих соединений.

Лутц [161] провел двумерное хроматографирование дигитоксина, содержащегося в пробах крови, и количественно определил его флуориметрически; порог чувствительности определения составил 0,05 мкг. Шторштейн [162] нашел, что силикагель, пропитанный 15 %-ным раствором формамида, при условии двукратного элюирования смесью метилэтилкетон—

ксилол (1:1) представляет собой наилучшую хроматографическую систему для разделения дигитоксина и 7 его метаболитов. С помощью модифицированного варианта метода, основанного на применении  $^{86}\text{Rb}$ , можно количественно определять соединения этой группы при содержании их вплоть до 0,5 нг на пятно; однако выход при этом составляет только 59 % [163]. Фабер и др. [164] обрабатывали в течение часа элюированные слои парами соляной кислоты, а затем измеряли интенсивность флуоресценции *in situ*; таким способом можно определять дигитоксин при содержании его порядка 1—2 нг. Выход составляет 99,1 %, стандартное отклонение результатов определения 11,2 %. Уотсон и др. [164a] использовали для выделения из мочи дигитоксина, дигитоксина и их метаболитов хроматографию на бумаге и ТСХ. Исходные соединения переводили во фторированные производные путем обработки гептафтормасляным ангидридом. Содержание этих производных определяли на газовом хроматографе с электронно-захватным детектором (ГХ-ЭЗД); чувствительность определения составляла  $25 \cdot 10^{-12}$  г.

Штейнеггер и ван дер Вальт [165] разделили на силикагеле некоторые сердечные гликозиды, полученные из подснежника, применив в качестве растворителя верхнюю фазу смеси этилацетат—пиридин—вода (5:1:4), а Штейдле [166] провел количественное определение соединений этой группы. Разделяющим растворителем служил метилэтилкетон, насыщенный водой. Соединения элюировали с пластин и анализировали элюат спектрофотометрически.

Лукас [167] хроматографировал К-строфантин на силикагеле смесью бутанол—формамид (17:2:1) и показал, что это лекарственное вещество состоит главным образом из К-строфантозида и К-строфантина- $\beta$  и содержит небольшое количество цимарина, а иногда примесь неидентифицированного гликозида. Приведены величины  $R_f \times 100$  первых трех соединений, равные соответственно 2,7; 5,1 и 7,0. Аглюкон характеризуется  $R_f \times 100$ , равным 8,2. Хорлин и др. [168] хроматографировали эти гликозиды на оксиде алюминия.

Для разделения гликозидов К-строфантина на силикагеле применялись также смеси хлороформ—этанол (3:1 и 1:1) [169, 170] и хлороформ—уксусная кислота—метанол (85:2:13) [171]. Картнер и Данхофер [172] разделяли гликозиды строфанта на слоях оксида магния смесью ацетон—вода—этилацетат (4:0,2:5,8).

Хёрхаммер и др. [173] исследовали гликозиды семян *Strophantus combe*, входящие в состав различных микстур и таблеток. Интервал величин  $R_f$  этих соединений и цвета их флуоресценции при УФ-облучении после опрыскивания концентрированной серной кислотой даны в табл. 26.10. Эти вещества

Величины  $R_{01}$  (относительно дигитоксина) для ряда агликонов гликозидов наперстянки (*Digitalis*), полученные на слоях силикагеля, и окраска пятен после опрыскивания обнаруживающим реактивом [157]<sup>a</sup>

Вещество	Этикетат-метод (16:1:1)	Хорофор-пипетин (6:1:1)	Окраска в видимом свете <sup>б</sup>		Флуоресценция в УФ-свете <sup>б</sup>		
			первоначальная	окончательная	первоначальная	окончательная	
			Дигитоксигенин	1,41	2,17	Синяя	Сине-зеленая
Гитоксигенин	1,10	1,28	Красная	Зеленая	Желто-коричневая	Желтая	
Дигоксигенин	0,99	1,22	Синяя	Сине-зеленая	Красновато-фиолетовая	Белая	
Гиталоксигенин	1,43	2,05	Красная	Зеленая	Желто-коричневая	Желтая	
Монодигитоксоза дигитоксигенина	1,27	1,41	Синяя	Синяя		Беловато-желтая	
Монодигитоксоза гитоксигенина	1,02	0,86	Коричневая	Зеленая	Сине-белая	Синяя	
Ланадоксиин	1,30	1,36	Синяя	Сине-зеленая	Желто-коричневая	Желтая	
Дигитоксин	1,00	1,00	"	Синяя	Сине-белая	Синяя	
Гитоксин	0,75	0,59	Красно-коричневая	Серо-синяя	Сине-белая	Синяя	
Дигоксин	0,68	0,62	Сине-серая	Синяя	Сине-фиолетовая	Белая	
Гиталоксин	1,01	0,92	Красно-фиолетовая	Зелено-синяя	Желтая	Желтая	
Пуруреагликозид А	0,14	0,05	Сине-черная	Сине-серая			
<b>Пуруреагликозид В</b>							
Глюкогиталоксин	0,09	0,02	Коричнево-красная	Серая	Сине-белая	Сине-белая	
Ацетилдигитоксин-1 ( $\alpha$ )	0,13	0,04	То же	"	Желто-коричневая	Желтая	
Ацетилдигитоксин-2 ( $\beta$ )	1,32	1,95	Синяя	Синяя			
Ацетилгитоксин- $\alpha$	1,42	2,03	"	"	Желто-коричневая	Желтая	
Ацетилгитоксин- $\beta$	1,04	1,39	Коричнево-красная	Серо-синяя	То же	"	
Ацетилдигоксин- $\beta$	1,17	1,47	То же	"	Сине-фиолетовая	Белая	
Ацетилдигоксин- $\alpha$	1,00	1,38	Серо-фиолетовая	Синяя	"	"	
Ацетилдигоксин- $\beta$	1,13	1,57	"	"	Желто-коричневая	Желто-белая	
Ланатозид А	0,26	0,18	Сине-серая	Сине-фиолетовая	Желто-коричневая	Сине-белая	
Ланатозид В	0,16	0,12	Красно-коричневая	Сине-серая	Красно-фиолетовая	Сине-белая	
Ланатозид С	0,15	0,08	То же	Сине-фиолетовая			
Одорозид Н	0,76	1,49	Сине-зеленая	Сине-зеленая		Желтая	
Стропезид	0,50	0,91	Красно-фиолетовая	Зеленая	Желто-коричневая	"	
Веродоксин	0,77	1,41	То же	Желто-зеленая	"	"	
<i>Digitalinum verum</i>	0,06	0,02	Красно-коричневая	"	"	"	
Дигитонин	0,00	0,00		Желтая			

<sup>a</sup> С разрешения автора и Svensk Farmaceutisk Tiolskrift.

<sup>б</sup> Реагент для опрыскивания (свежеприготовленный): 0,5 мл *n*-анисового альдегида, 5 мл 70 %-ной хлорной кислоты, 10 мл уксуса, 40 мл воды. После опрыскивания пластинку прогревают 4—5 мин при 75—80°C.

Таблица 26 10

Величины  $R_f$  соединений, содержащихся в семенах *Strophanthus combe*, полученные на силикагеле со смесью этилацетат—пиридин—вода (5:1:4), и цвета пятен [173]<sup>a</sup>

Соединение	Интервал величин $R_f$	Флуоресценция при УФ-облучении <sup>b</sup>
К-Строфантозид	0,05	Зеленовато-желтая
Г-Строфантин	0,09—0,12	Желто-оранжевая (после нагревания)
Эризимозид	0,18—0,22	Зеленовато-желтая
К-Строфантин-β	0,25—0,28	”
Цимарол	0,60—0,64	Блеклая коричневая
Цимарин	0,70—0,74	Зеленовато-желтая
Периплоцимарин	0,77—0,80	Желто-серая
Сарментозид А	0,30—0,35	Интенсивная желтая
Эмицимарин	0,34—0,38	Блеклая зеленая
Сарментоцимарин	0,82—0,86	Красно-коричневая
Сарверозид	0,89—0,92	”

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Deutscher Apotheker-Verlag

<sup>b</sup> Флуоресценция при УФ-облучении после опрыскивания серной кислотой.

обнаруживают также опрыскиванием реагентом Кедде, который дает пурпурные пятна.

Сун и Ланг [174] опубликовали результаты хроматографического исследования сердечных гликозидов, которое они проводили на незакрепленных слоях нейтрального оксида алюминия. В сочетании с этим адсорбентом применяли следующие растворители: эфир, смеси хлороформ—метанол (99:1 и 95:5), ксилол—метилэтилкетон (1:1) и хлороформ—диоксан—бутанол (14:1:1).

## 10. АНТИКОАГУЛЯНТЫ

Рейш и др. [174a] хроматографировали смесь 5 антикоагулянтов — производных 4-оксикумарина. Разделение проводили на силикагеле G, элюируя пробу смесью бензола (насыщенного при комнатной температуре 99 %-ной муравьиной кислотой) и метилэтилкетона, взятых в соотношении 20:1. Камм [175] использовал смесь диоксан—толуол—изопропанол—25 %-ный ам-

миак и насыщенную аммиаком смесь бутанол—амиловый спирт (1:1) для разделения на силикагеле производных кумарина и родственных им соединений. Семь производных кумарина были разделены на силикагеле 60F<sub>254</sub> смесью бензол—тетрахлорид углерода—диоксан—уксусная кислота (50:40:10:1) [176]. Обнаружение пятен можно было проводить на флуоресцирующих слоях при УФ-облучении. Компоненты составов, включающих гепарин, авторы работы [177] разделили на целлюлозе MN, элюируя смесями 25 %-ный аммиак—пиридин—вода (12:7:1) или бутанол—вода—уксусная кислота (3:1.1) [177].

## 11. ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Большинство лекарственных средств данной группы — это производные сульфонилмочевины или гуанидина. Беумлер и Риппштейн [178] использовали адсорбционные слои силикагеля и целлюлозы (1:1) и элюирующий растворитель бензол—метанол (4:1) для разделения производных сульфонилмочевины и тот же адсорбент и подкисленный уксусной кислотой метанол для разделения производных гуанидина Стрикленд [179] разделил ацетогексамид, хлорпропамид, гидрохлорид фенформина и толбутамид на силикагеле с пятью различными растворителями, в том числе смесями ацетон—бензол—вода (13:6:1) и диоксан—аммиак (уд. масса 0,88)—вода (100.3.10). Пятна соединений обнаруживали с помощью реактивов Т-239, Т-274 и нингидринового реактива. Гувен и Озсари [180] хроматографировали препараты инсулина на силикагеле смесями 0,1 н. соляная кислота—96 %-ный этанол (1:1) и 0,5 н. соляная кислота—этанол—ацетон (5:3.0,5).

## 12. ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ СРЕДСТВА

Пиппенджер и др. [181] использовали для разделения противосудорожных средств, экстрагированных из крови и мочи, слои адсорбента SilicAR 7-GF (фирма Mallinckrodt) и такие растворители, как смеси хлороформ—ацетон (9:1), тетрагидроуглерода—ацетон (7:3) и бензол—ацетон (4:1). С каждым из растворителей получено по одной хроматограмме. Порог чувствительности обнаружения при УФ-облучении хроматограмм составлял от 1 до 2 мкг Вад и др. [182] использовали метод непосредственного отражения для анализа 5 экстрактов противосудорожных препаратов из сыворотки крови. Экстракты хроматографировали на слоях силикагеля со смесью хлороформ—ацетон (17:3). Брейер [183] определял содержание карбамазепина в сыворотке крови методом отражательной фотометрии.



### 13. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ПРОТИВ МАЛЯРИИ

Хинин, извлеченный из коры хинного дерева, хроматографировали на силикагеле смесь метилэтилкетон—метанол—вода (6:2:1) и в обратном направлении смесь хлороформ—ацетон—диэтиламин (5:4:1) [184]. Хинидин, дигидрохинидин и их метаболиты разделяли при 4°C на силикагеле смесь метанол—ацетон (4:1) и определяли содержание элюированных соединений флуоресцентным методом [185]. Производные акридина, используемые для лечения малярии, анализировали на силикагеле, элюируя смесями бензол—ацетон—28 %-ный аммиак (37:37:1) [186], пропанол—этилацетат—аммиак (13:15:12) [187] и др. Берберин, входящий в состав лекарственных порошков (*Berberis spp.*), выделяли методом хроматографии на силикагеле смесь бутанол—уксусная кислота—вода (7:1:2) [188].

### 14. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ОТ КАШЛЯ

Нейдлен и др. [189] разделили ряд лекарственных препаратов от кашля на силикагеле GF, используя как растворитель смесь хлороформ—этанол (60:15), содержащую две капли аммиака. Прост и др. [190], применив трехкратное элюирование смесь гексан—хлороформ (9:1), хроматографировали на силикагеле в атмосфере аммиака ряд производных пропаргила. Обнаруживающим реактивом служил иодоплатинатный реагент Т-149. Брантер и Вамос [191] хроматографировали на силикагеле бензонатат, представляющий собой смесь соединений, элюируя пробу смесями метилэтилкетон—вода, взятых в разных соотношениях.

### 15. БАКТЕРИЦИДНЫЕ СРЕДСТВА

Браво Орденез и Гернандез-А [192] разделили дихлорофен и гексахлорофен, применяемые как дезинфицирующие добавки к мылу. Хроматографирование они вели на слоях силикагеля, закрепленных крахмалом; элюирующим растворителем служил гептан, насыщенный уксусной кислотой. При этом были получены  $R_f$  соответственно 0,32 и 0,63. Количественный анализ указанных соединений проводили, элюируя пятна и определяя поглощение элюата в УФ-области при длине волны 290 нм. В сочетании с силикагелем G использовали также такие растворители, как метилэтилкетон, смеси изобутанол—25 %-ный аммиак—вода (21:6:10) и изобутанол—молочная кислота—вода (5:1:2) [193]. Хлоргексидин идентифицировали элюиро-

ванием на силикагеле смесь бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1) по  $R_f$ , равному 0,64 [194]. Кениг [195] разделил группу бактерицидных веществ на силикагеле GF<sub>254</sub>, элюируя пробу смесь бензол—ацетон (4:1). Бромированные салициланилиды хроматографировали на DEAE-целлюлозе смесь метанол—уксусная кислота (19:1) [196]. Выделению низших бромированных соединений способствовало предварительное элюирование метанолом, а в тех случаях, когда требовалось более четкое разделение, эффективным оказалось также многократное элюирование. Соединения четвертичного аммония можно разделить на силикагеле G смесь этанол—хлороформ—вода (36:60:1) [197] или хлороформ—изопропанол—аммиак (5:5:1) [198]. Антисептические средства на основе нитрофурана и акридина были разделены смесь ацетон—хлороформ—эфир—бутанол (8:4:6:1) [199]. Циноксаин и родственные соединения анализировали на силикагеле, элюируя смесь этилацетат—хлороформ (7:3) [200]. Пятна соединений наблюдали визуально в УФ-свете.

### 16. ПРОТИВОЗАЧАТОЧНЫЕ СРЕДСТВА

Поскольку химические противозачаточные средства представляют собой стероиды, для их разделения и количественного определения пригодны те же хроматографические системы, которые предназначены для разделения соединений этого класса. Редер [201] исследовал 19 патентованных составов, пользуясь силикагелем G и смесью этилацетат—циклогексан—ацетон (5:15:2) или применяя двумерное хроматографирование сначала указанным растворителем, а затем смесь циклогексан—этилацетат (23:27). Таким способом можно выделить хлормадинодиацетат, мегестролацетат, норэтистеронацетат, этинодиолацетат, линоэстренол, этинилэстрадиол и местранол. Чтобы пятна соединений можно было наблюдать визуально, хроматограммы опрыскивали смесь 85 %-ная фосфорная кислота—метанол (1:1) или трихлорид сурьмы—уксусная кислота (1:1, масса/объем) и прогревали при 120—130°C. Симард и Лодж [202] разделили 11 компонентов, входящих в выпускаемые в Канаде составы, двумерным элюированием на силикагеле. Элюирующими растворителями служили смесь хлороформ—метанол (9:1) и затем смесь бензол—метанол (19:1) или сначала смесь бензол—ацетон (4:1), а затем смесь метилэтилхлорид—метанол—вода (150:9:0,5). Пятна обнаруживали облучением УФ-светом или опрыскиванием серной кислотой с последующим нагреванием. Шрофф и Шоу [203] применили денситометрию *in situ* для определения содержания норэтин-дрона и местранола.

### 17. МОЧЕГОННЫЕ СРЕДСТВА

Мочегонные средства типа тиазидов хроматографировали на силикагеле смесями ацетон—бензол—вода (3:3:1, 4:3:1 и 5:3:2) [204], толуол—ксилол—диоксан—изопропанол—25 %-ный аммиак (1:1:3:3:1 [205] и 1:1:3:3:2 [206]), бензол—этилацетат (1:3 [206] и 2:8 [207], этилацетатом с добавкой 1,5 % воды [208], смесями этилацетат—бензол—аммиак—25 %-ный метанол (25:20:1:5), *n*-гексан—ацетон—диэтиламин (6:3:1 и 2:2:1) и хлороформ—метанол—диэтиламин (16:3:1) [209]. Смит и Герман [210] предложили методику предварительного (до хроматографирования на тонком слое) отделения тиазидов от других соединений, входящих в состав таблеток. В качестве обнаруживающих реактивов применяли реактив Фирона (Т-240), аммиачный раствор сульфата меди (Т-75), флуоресцеин-бромный реактив (Т-130), реактив Бреттона—Маршалла (Т-174 и Т-235, чувствительность обнаружения 5 мкг). Если в состав смеси входят также сульфонамидные лекарственные вещества, то их можно отличить от тиазидов, опрыскивая хроматограмму реактивом Эрлиха (Т-90). Тиазиды с этим реактивом не взаимодействуют, а сульфонамидные соединения дают желтые пятна [207].

Гувен [211] разделил на силикагеле G четыре ртутьсодержащих мочегонных средства, проводя элюирование смесью бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1) и обнаруживая пятна реактивом Т-75.

### 18. СЛАБИТЕЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

Бхандари и Уокер [212] хроматографировали на силикагеле GF 11 соединений, обладающих слабительным действием, используя 6 различных растворителей, в том числе смеси хлороформ—ацетон (1:1) и хлороформ—бензол—метилэтилкетон (1:1:1). Датта и Гхош [213] разделили входящие в лекарственные смеси фенолфталеин и антрахиноны жостера на силикагеле G, элюируя пробу смесью бензол—этилацетат—уксусная кислота (75:24:1). Пятна антрахинонов становились видимыми при облучении УФ-светом, их величины  $R_f$  равны 0,55, 0,68 и 0,95; фенолфталеин ( $R_f=0,48$ ) обнаруживали опрыскиванием 5 %-ным раствором гидроксида калия (об антрахинонах см. в следующем разделе).

### 19. НЕКОТОРЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Штейнеггер и Гебисторф [214] выявили с помощью ТСХ от 5 до 10 % нежелательных примесей в экстрактах листьев страмония, белладонны и гиосциамуса. Хёрхаммер и др. [215],

проводя хроматографирование экстрактов в петролейном эфире, обнаружили, что экстракт корней *Pimpinella saxifraga* заменен на экстракт корней *Heracleum spondylium*. Штейнеггер и Гебисторф [216] исследовали лекарственные препараты, полученные из *Tilia*. Хёрхаммер и др. [217] анализировали экстракты листьев, цветов и плодов *Crataegus alyacantha*, а также лекарственные препараты, изготовляемые из этих экстрактов, используя ТСХ на силикагеле; элюирующим растворителем служила смесь этилацетат—метанол—вода (10:2:1). Хейссер [218] предложил подробную методику количественного анализа ряда веществ, входящих в состав лекарственных растений, в том числе капсаицина и стручкового перца, морфия и порошкообразного опиума, дигитоксина и эскулина, а также резерпина.

Фассина и др. [219—221] хроматографировали экстракты корневищ *Atractylis gummifera*. Гликозид (атрактилат калия) можно отделить от агликона (атрактилигена) при хроматографировании на силикагеле смесью бутанол—метанол—вода (8:1:1), в этой системе их величины  $R_f$  равны соответственно 0,17 и 0,57; при хроматографировании на силикагеле со смесью пропанол—ксилол—вода (7:2:1) их  $R_f$  равны 0,16 и 0,61. Корневища, доставленные из Сицилии, содержали в 5—10 раз больше атрактилозида, чем корневища, полученные из Сардинии.

Хёрхаммер и др. [222] определили величины  $R_f$  арбутина (0,24—0,30), гидрохинона (0,89—0,93) и метилгидрохинона (0,96—0,97). Эти величины получены при элюировании смесью этилацетат—метанол—вода (100:16,5:13,5) при длине пути элюирования 15 см на тонких слоях силикагеля Woelm. Указанные вещества содержатся в лекарственных препаратах из листьев *Arctostaphylos Uva-ursi*. Глистогонное действие корневищ мужского папоротника обусловлено наличием в них флороглюцидов. Эти соединения изучены Шанцем и др. [223, 224] и Шталем и Шорном [225]. Шанц и соавторы проводили хроматографирование на слоях силикагеля G, обработанных буферным раствором, состоящим из 0,1 М раствора лимонной кислоты и 0,2 М буферного раствора динатрийфосфата с pH 6, применяя в качестве элюирующего растворителя смесь равных количеств хлороформа и петролейного эфира с добавкой 5 % этанола. В результате были получены следующие величины  $R_f$ : филиксовая кислота 0,90, аспидин 0,88, альбаспидин 0,87, дезаспидин 0,82, аспидиол 0,41, флораспин 0,35 и флаваспидиновая кислота 0,07. Пятна соединений обнаруживали, опрыскивая пластинки смесью равных частей 1 %-ного раствора хлорида железа(III) и 1 %-ного раствора феррицианида калия с добавлением одной капли концентрированной азотной кислоты на каждый миллилитр смеси. При опрыскивании на пластинке появляются темно-синие пятна. Другой способ обнаружения

предусматривает опрыскивание пластинок 0,1 %-ным раствором красителя прочная синяя соль В. Шанц и др. [226] применили этот метод для количественного анализа указанных веществ. После разделения соединения элюировали с хроматограммы и спектрофотометрически или колориметрически определяли поглощение элюата.

Хёрхаммер и др. [227] разделили на силикагеле антрахиноновые лекарственные вещества, входящие в состав различных растений, в частности *Aloe*, *Rhamnus frangula*, *R. purshiana*, *Rheum* и листьев *Senna*, элюируя пробы смесями этилацетат—метанол—вода (100:16,5:13,5) и пропанол—этилацетат—вода (4:4:3). Пятна соединений обнаруживали при облучении УФ-светом с длиной волны 366 нм или опрыскивали слой сначала 10 %-ным метанольным раствором гидроксида калия, а затем 0,5 %-ным раствором прочной синей соли (Fast Blue Salt). Зипер и др. [228] изучали также полиоксиантрахиноны *Rhamnus frangula*. Эти антрахиноны разделяли в виде гликозидов на силикагеле смесями дихлорметан—метанол (10:3 и 10:0,5) и бензол—тетрахлорид углерода (1:1). Количественные измерения проводили, спектрофотометрируя элюированные экстракты. Обычно с трудом разделяемые хризофанол и фицион можно разделить на силикагеле G смесью петролейного эфира и этилацетата (9:1) [229].

Беме и Крейциг [230, 231] использовали как хроматографию на бумаге, так и тонкослойную хроматографию для исследования ряда различных видов алоэ. Яниак и Бёмерт [232] отделили сенниндин А+В от реина на слоях силикагеля G, элюируя пробу смесью бензола и уксусной кислоты (2:1). Описанный ими метод был использован для количественного определения содержания алоина. Джерритсма и ван Рееде [233] использовали ТСХ на силикагеле для выделения алоина и определения его содержания в высушенном и свежем соке алоэ. Они проводили разделение смесью хлороформа и этанола (3:1). После того как при облучении УФ-светом было определено положение пятна алоина, это вещество экстрагировали метанолом и определяли его содержание, измеряя спектральное поглощение экстракта при длине волны 355 нм. Точность анализа составляла около 2 %.

## 20. ПРОЧИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Краус и Вепровска [234—236] опубликовали данные об использовании ТСХ для анализа лекарственных свечей. Джонс и др. [237] определяли стильбэстрол в свечах.

Крейс и др. [238] использовали различные системы ТСХ

для выделения и идентификации терефталанилидов, экстрагированных из крови и других биологических жидкостей.

Рагацци [239] разделил на тонких слоях кремневой кислоты несколько окрашенных производных феназина, применяемых как противотуберкулезные средства; причем анализ методом ТСХ оказался более эффективным, чем хроматография на бумаге. При определении величин  $R_f$  он использовал самые различные комбинации растворителей. Гувен [240] разделил на силикагеле четыре противотуберкулезных препарата, пользуясь метанолом, этанолом и смесью хлороформа с метанолом (17:3). Обнаруживающим реактивом служил раствор сульфата меди (реактив Т-75).

Велан и Плаа [241] изучали метаболизм сульфобромфталейна (применяемого для исследования функции печени). Применяемый для исследования достаточности слизистой деятельности метирапон и продукты его метаболизма разделили на силикагеле смесью метиленхлорид—этанол (25:1) [241].

Беумлер и др. [242] применили ТСХ на силикагеле для допингового контроля скаковых лошадей. Различные допинговые вещества, вводимые перорально, внутривенно, внутримышечно и подкожно, можно через короткий промежуток времени обнаружить в слюне в довольно больших количествах. Каравиа и др. [243] определяли методом ТСХ содержание амфетамина, метиламфетамина и эфедрина в моче лошадей. Этот метод пригоден и для допингового контроля спортсменов. Дебакере и Ларуэл [244] нашли, что из биологических жидкостей моча — наилучший объект для обнаружения алкалоидного допинга у скаковых лошадей.

ТСХ применяли также для идентификации консерватов [245, 246] и глазных капель [247].

Методом ТСХ были исследованы также противоглистные средства [248, 249], средства для лечения алкоголизма [250], противозипелитические [251—253], антигипотензивные [254—256] (см. также среди мочегонных средств) средства, противоопухолевые агенты [257—259] и средства против заболеваний двигательных органов [260].

Помимо работ, цитированных выше в специальных разделах, опубликовано большое число обзоров по применению ТСХ для исследования лекарственных веществ, некоторые из наиболее общих обзоров указаны в списке литературы [261—264].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tompsett S. L., Analyst (London), 93, 740 (1968).
2. Mulé S. J., J Chromatogr, 39, 302 (1969)
3. Dole V. P., Kim W. K., Englitis T., J. Am Med Assoc, 198, 115 (1966)

4. *Montalvo J. G. Jr., Klein E., Eyer D., Harper B.*, J. Chromatogr., **47**, 542 (1970).
5. *Heaton A. M., Blumberg A. G.*, J. Chromatogr., **41**, 367 (1969).
6. *Kaistha K. K., Jaffe J. H.*, J. Chromatogr., **60**, 83 (1971).
7. *Serfontein W. J., Botha D., De Villiers L. S.*, J. Chromatogr., **115**, 507 (1975).
8. *Broich J. R., Hoffman D. B., Andryauskas S., Galante L., Umberger C. J.*, J. Chromatogr., **60**, 95 (1971).
9. *Fujimoto J. M., Wang R. I. H.*, Toxicol. Appl. Pharmacol., **16**, 186 (1970).
10. *Mulé S. J., Bastos M. L., Jukofsky D., Saffer E.*, J. Chromatogr., **63**, 289 (1971).
11. *Bastos M. L., Jukofsky D., Saffer E., Chekedel M., Mulé S. J.*, J. Chromatogr., **71**, 549 (1972).
12. *Bastos M. L., Jukofsky D., Mulé S. J.*, J. Chromatogr., **81**, 93 (1973).
- 12a. *Weissman N., Lowe M. L., Beattie J. M., Demetriou J. A.*, Clin. Chem., **17**, 875 (1971).
13. *Broich J. R., Hoffman D. B., Goldner S. J., Andryauskas S., Umberger S. J.*, J. Chromatogr., **63**, 309 (1971).
14. *Hoffman D. B., Umberger C. J., Goldner S., Andryauskas S., Mulligan D., Broich J. R.*, J. Chromatogr., **66**, 63 (1972).
15. *Meola J. M., Vanko M.*, Clin. Chem., **20**, 184 (1974).
16. *Kaistha K. K., Tadrus R.*, J. Chromatogr., **109**, 149 (1975).
17. *Kaistha K. K.*, J. Pharm. Sci., **61**, 655 (1972).
18. *Sohn D., Simon J., Hanna M. A., Gahli G.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 294 (1972).
19. J. Chromatogr. Sci., **10**, 352 (1972), автор не указан.
- 19a. J. Chromatogr. Sci., **12**, 328 (1974), автор не указан.
20. *Machata G.*, Microchim. Acta, **47**, 79 (1960).
21. *Baumlér J., Rippstein S.*, Pharm. Acta Helv., **36**, 382 (1961).
22. *Porges E.*, Bratislav. Lek. Listy, **44-1**, 3 (1964), Chem. Abstr., **60**, 11 847 (1964).
23. *Reisch J., Bornfleth H., Rheinbay J.*, Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg., **108**, 1183 (1963).
24. *Frahm M., Gottesleben A., Soehring K.*, Pharm. Acta Helv., **38**, 785 (1963).
25. *Frahm M., Gottesleben A., Soehring K.*, Arzneim.-Forsch., **11**, 1008 (1961).
26. *Niwaguchi T., Oki H.*, Kagaku Keisatsu Kenkyusho Hokoku, **16**, 41 (1963); Chem. Abstr., **59**, 15 122 (1963).
27. *Sahli M., Oesch M.*, J. Chromatogr., **14**, 526 (1964).
28. *Shellard E. J., Osisiogu I. U.*, Lab. Pract., **13**, 516 (1964).
29. *Curry A. S., Fox R. H.*, Analyst (London), **93**, 834 (1968).
30. *Dutkiewicz T., Kończalik J.*, Farm. Polska, **24**, 475 (1968).
31. *Huang J.-T., Wang K.-T.*, J. Chromatogr., **31**, 587 (1967).
32. *Rosenthal W. A., Kaser M., Milewski K. N.*, Clin. Chim. Acta, **33**, 51 (1971).
33. *Baumlér J., Rippstein S.*, Arch. Pharm., **296**, 301 (1963).
34. *Lindfors R., Ruohonen A.*, Arch. Toxicol., **19**, 402 (1962).
35. *Lindfors R.*, Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. (Helsinki), **41**, 355 (1963).
36. *Vercruyse A.*, Chromatogr. Symp., 2nd, Brussels, **1962**, 207.
37. *Gaenshirt H.*, Arch. Pharm., **296**, 73 (1963).
38. *Lehmann H., Karamustafaoglu V.*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **14**, 554 (1962).
39. *Wright J. T.*, J. Clin. Pathol., **7**, 61 (1954).
40. *Petzold J. A., W. Camp Jr., E. R. Kirch.*, J. Pharm. Sci., **52**, 1106 (1963).
41. *Kelleher J., Rollason J. G.*, Clin. Chim. Acta, **10**, 92 (1964).
42. *De Zeeuw R. A., Wijsbeek J.*, J. Chromatogr., **48**, 222 (1970).
43. *Cochin J., Daly J. W.*, J. Pharmacol. Exp. Therap., **139**, 154 (1963).
44. *Sunshine I., Rose E., LeBeau J.*, Clin. Chem., **9**, 312 (1963).
45. *Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J.*, Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
46. *Eberhardt H., Freundt K. J., Langbein J. W.*, Arzneim.-Forsch., **12**, 1087 (1962).
47. *Dijkhuis I. C.*, Pharm. Weekbl., **106**, 745 (1971).
48. *Paulus W., Hoch W., Keymer R.*, Arzneim.-Forsch., **13**, 609 (1963).
49. *Mellinger T. J., Keller C. E.*, J. Pharm. Sci., **51**, 1169 (1962).
50. *Cochin J., Daly J. W.*, J. Pharmacol. Exp. Therap., **139**, 160 (1963).
51. *Kofoed J., Fabierkiewicz C., Lucas G. H. W.*, J. Chromatogr., **23**, 410 (1966).
52. *Zingales I.*, J. Chromatogr., **31**, 405 (1967).
53. *Kraus L., Dumont E.*, J. Chromatogr., **56**, 159 (1971).
54. *Hulshoff A., Perrin J. H.*, J. Chromatogr., **129**, 249 (1976).
55. *Noirfalise A., Grosjean M. H.*, J. Chromatogr., **16**, 236 (1964).
56. *Ferrari M., Tóth C. S.*, J. Chromatogr., **9**, 388 (1962).
57. *Seno S., Kessler W. V., Christian J. E.*, J. Pharm. Sci., **53**, 1101 (1964).
58. *Rusiecki W., Henneberg M.*, Acta Polon. Pharm., **21**, 25 (1964).
59. *Eberhardt H., Lerbs O. W., Freundt K. J.*, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., **245**, 136 (1963).
60. *Eberhardt H., Lerbs O. W., Freundt K. J.*, Arzneim.-Forsch., **13**, 804 (1963).
61. *Turano P., Turner W. J.*, J. Chromatogr., **64**, 347 (1972).
62. *Kaul P. N., Conway M. W., Clark M. L.*, Nature, **226**, 372 (1970).
63. *Tewari S. N.*, Z. Anal. Chem., **275**, 31 (1975).
64. *Eiden F., Stachel H. D.*, Deut. Apoth.-Ztg., **103**, 121 (1963).
65. *Fiori A., Marigo M.*, Nature, **182**, 943 (1958).
66. *Marigo M.*, Minerva Medicoleg., **81**, 70 (1961).
67. *Marigo M.*, Arch. Kriminol., **128**, 99 (1961), Chem. Abstr., **56**, 5068 (1962).
68. *Baumlér J., Rippstein S.*, Helv. Chim. Acta, **44**, 2208 (1961).
69. *Schuetz C., Post D., Schewe G., Schuetz H.*, Z. Anal. Chem., **262**, 282 (1972).
70. *Chodakowski A. M.*, Farm. Polska, **25**, 637 (1969).
71. *Cimbura G.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 287 (1972).
72. *Blazek J., Stejskal Z.*, Pharmazie, **27**, 506 (1972).
73. *Clarke E. G. C.*, J. Forensic Sci. Soc., **7**, 46 (1967).
74. *Shaw M. A., Peel H. W.*, J. Chromatogr., **104**, 201 (1975).
75. *Niwaguchi T., Inoue T.*, J. Chromatogr., **43**, 510 (1969).
76. *DalCortiva L. A., Brvich J. R., Dihberg A., Newman B.*, Anal. Chem., **38**, 1959 (1966).
77. *Alliston G. V., De Faubert Maunder M. J., Phillips G. F.*, J. Pharm. Pharmacol., **23**, 555 (1971).
78. *Genest K.*, J. Chromatogr., **19**, 531 (1965).
79. *Niwaguchi T., Inoue T.*, J. Chromatogr., **59**, 127 (1971).
- 79a. *Ibid.*, J. Chromatogr., **121**, 165 (1976).
80. *Korte F., Sieper H.*, J. Chromatogr., **13**, 90 (1964).
81. *Vinson J. A., Hooyman J. E.*, J. Chromatogr., **106**, 196 (1975).
82. *Tewari S. N., Harpalani S. P., Sharma S. C.*, Chromatographia, **7**, 205 (1974).
83. *Segelman A. B.*, J. Chromatogr., **82**, 151 (1973).
84. *Grlic L.*, Acta Pharm. Jugosl., **24**, 63 (1974).
85. *Stone H. M., Stevens H. M.*, J. Forensic Sci. Soc., **9**, 31 (1969).
86. *Just W. W., Werner G., Wiechmann M.*, Naturwissenschaften, **59**, 222 (1972).
87. *Vinson J. A., Patel D. D., Patel A. H.*, Anal. Chem., **49**, 163 (1977).
88. *Ivanon T. P.*, Monatsh. Chem., **97**, 1499 (1966).
89. *Parker J. M., Fiske H. L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **55**, 876 (1972).
90. *Merkus F. W. H. M., Jaspers-van Wouw M. J. G., Roovers-Bollen J. F. C.*, Pharm. Weekbl., **107**, 98 (1972).
91. *Sterling A.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 268 (1972).
92. *Obersteg J. Im., Baumlér J.*, Arch. Toxicol., **19**, 339 (1962).
93. *Drabner J., Bauer H., Scherwd W.*, Arch. Toxicol., **21**, 367 (1966).
94. *Alessandro A., Mari F., Settecase S.*, Farmaco, Ed. Prat., **22**, 437 (1967).
95. *Henwood C. R.*, Nature, **216**, 1039 (1967).

96. Adank K., Schmidt T., *Chimia*, **23**, 299 (1969).
97. Guven K. C., *Eczacilik Bul.*, **10**, 43 (1968).
98. Fialoa R. M., Corona G. L., *J. Pharm. Sci.*, **58**, 764 (1969).
99. Viacina A., Gouezo F., Gola C., *J. Chromatogr.*, **45**, 94 (1969).
100. McLinden V. J., *J. Forensic Sci. Soc.*, **10**, 135 (1970).
- 100a. Thunell S., *J. Chromatogr.*, **130**, 209 (1977).
101. Fike W. W., *Sunshine I.*, *Anal. Chem.*, **37**, 127 (1965).
102. Boonen F., *J. Pharm. Belg.*, **27**, 233 (1972).
103. Mulé S. J., *Anal. Chem.*, **36**, 1907 (1964).
104. Mulé S. J., *J. Chromatogr., Sci.*, **10**, 275 (1972).
105. Cochlin J., Daly J. W., *Experientia*, **18**, 294 (1962).
106. Vidic E., *Arch. Toxikol.*, **19**, 254 (1961).
107. Saršunová M., Schwarz V., *Pharmazie*, **18**, 34 (1963).
108. Gaenshirt H., *Arch. Pharm.*, **296**, 129 (1963).
109. Frodyma M. M., Lieu V. T., Frei R. W., *J. Chromatogr.*, **18**, 520 (1965).
110. Fuwa T., Kido T., Tanaka H., *Yakuzaigaku*, **22**, 269 (1962). *Chem. Abstr.*, **59**, 7319 (1963).
111. Emmerson J. L., Anderson R. C., *J. Chromatogr.*, **17**, 495 (1965).
112. Thompson R. D., Johnson G. L., *J. Chromatogr.*, **88**, 361 (1974).
113. Radulović D., Blagojević Z., Živanov-Stakić D., *Acta Pharm. Jugosl.*, **24**, 173 (1974).
114. Blagojević Z., Radulović D., Živanov-Stakić D., *Acta Pharm., Jugosl.*, **25**, 263 (1975).
115. Hsiu H. C., Shih T. B., Wang K.-T., *J. Chromatogr.*, **41**, 489 (1969).
116. Chiang H.-C., Chiang T.-M., *J. Chromatogr.*, **47**, 128 (1970).
117. Unterhalt B., *Arch. Pharm.*, **303**, 445 (1970).
118. Pellerin F., Mancheron D., *Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., Lect. Rap.*, 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 501.
119. Formanek I., Fulop L., Vereph I., *Rev. Med. (Targu-Mures)*, **12**, 300 (1966).
120. Waldi D., *Arch. Pharm.*, **295**, 125 (1962).
121. Beckett A. H., Choulis N. H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **15**, 236T (1963).
122. Beckett A. H., Choulis N. H., 23rd Intern. Kongr. Pharmaz. Wissenschaften, Muenster, September 9—14, 1963.
123. Choulis N. H., *J. Pharm. Sci.*, **56**, 196 (1967).
124. Vahidi A., Sankar D. V. S., *J. Chromatogr.*, **43**, 135 (1969).
125. Segura-Cardona R., Soehring K., *Med. Exp.*, **10**, 251 (1964).
126. Sapira J. D., *J. Chromatogr.*, **42**, 134 (1969).
127. Choulis N. H., Carey C. E., *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1048 (1968).
128. Roser R., Tocci P. M., *J. Chromatogr.*, **72**, 207 (1972).
129. Van Hoof F., Heindricks A., *Anal. Chem.*, **46**, 286 (1974).
130. Loh H. H., Ho I. K., Lipscomb W. R., Cho T. M., Selewski C., *J. Chromatogr.*, **68**, 289 (1972).
131. Saršunová M., *Pharmazie*, **18**, 748 (1963).
132. Guven K. C., Hincal A., *Eczacilik Bul.*, **8**, 202 (1966).
133. Fresen J. A., *Pharm. Weekbl.*, **102**, 659 (1967).
134. Roeder E., Mutschler E., Rochelmeyer H., *Pharm. Acta Helv.*, **44**, 644 (1969).
135. De Zeeuw R. A., *J. Pharm. Pharmacol. (Suppl.)*, **20**, 54 (1968).
136. Messerschmidt W., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **111**, 597 (1971).
137. Reisch J., Bornfleth H., Rheinbay J., *Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg.*, **107**, 920 (1962).
138. Wollish E. G., Schmall M., Hawrylyshyn M., *Anal. Chem.*, **33**, 1138 (1961).
139. Bičan-Fišter T., Kajganović V., *J. Chromatogr.*, **11**, 492 (1963).
140. *Ibid.*, **16**, 503 (1964).
141. Klein S., Kho B. T., *J. Pharm. Sci.*, **51**, 966 (1962).
142. Kho B. T., Klein S., *J. Pharm. Sci.*, **52**, 404 (1963).
143. Karpitschka N., *Mikrochim. Acta*, **1963**, 157.
144. Van der Venne M. Th., T'Siobbel J. B., *Chromatogr., Symp.*, 2nd, Brussels, **1962**, 196.
145. Biagi G. L., Barbaro A. M., Guerra M. C., Cantelli-Forti C., Gandolfi O., *J. Chromatogr.*, **106**, 349 (1975).
146. De Zeeuw R. A., *J. Chromatogr.*, **48**, 27 (1970).
147. Lepri L., Desideri P. G., Tanturli G., *J. Chromatogr.*, **93**, 201 (1974).
148. Walash M. I., Agarwal S. P., *J. Pharm. Sci.*, **61**, 277 (1972).
149. Sigel C. W., Woolley J. L., Nichol C. A., *J. Pharm. Sci.*, **64**, 973 (1975).
150. Tschesche R., Freytag W., Sntazke G., *Chem. Ber.*, **92**, 3053 (1959).
151. Reichelt J., Pitra J., *Cesk. Farm.*, **12**, 416 (1963).
152. Reichelt J., Pitra J., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 1709 (1962).
153. Braeckman P., van Sevaeren R., Haerincx F., *Pharm. Tijdschr. Belg.*, **40**, 129 (1963); *Chem. Abstr.*, **60**, 11 849 (1964).
154. Zurkowska J., Lukaszewski W., Ozarowski A., *Acta Pol. Pharm.*, **20**, 115 (1963).
155. Zurkowska J., Ozarowski A., *Acta Pol. Pharm.*, **22**, 83 (1965).
156. Fauconnet L., Waldesbuehl M., *Pharm. Acta Helv.*, **38**, 423 (1963).
157. Sjoeholm I., *Svensk Farm. Tidskr.*, **66**, 321 (1962).
158. Peckic B., *Acta Pharm. Jugosl.*, **18**, 141 (1968).
159. Boasio M. L., *J. Chromatogr.*, **73**, 279 (1972).
160. Nover L., Juettner G., Noack S., Baumgarten G., Luckner M., *J. Chromatogr.*, **39**, 419 (1969).
161. Lutz U., *Oesterr. Apoth.-Ztg.*, **25**, 250 (1971).
162. Storstein L., *J. Chromatogr.*, **117**, 87 (1976).
163. Gjerdrum K., *Acta Med. Scand.*, **187**, 371 (1970).
164. Faber D. B., De Kok A., Brinkman U. A. T., *J. Chromatogr.*, **143**, 95 (1977).
- 164a. Watson E., Tramell P., Kalman S. M., *J. Chromatogr.*, **69**, 157 (1972).
165. Steinegger E., van der Walt J. H., *Pharm. Acta Helv.*, **36**, 599 (1961).
166. Steindle W., *Planta Med.*, **9**, 435 (1961).
167. Lukas G., *Sci. Pharm.*, **30**, 47 (1962).
168. Хорлуин А. Я., Бочков А. Ф., *Изв. АН СССР, Отд. хим. наук*, **1962**, 1120.
169. Lutomski J., Kowalewski Z., Kortus M., *Diss. Pharm. Pharmacol.*, **18**, 409 (1966).
170. *Ibid.*, **21**, 241 (1969).
171. Corona G. L., Raiteri M., *J. Chromatogr.*, **19**, 435 (1965).
172. Kartnig T., Danhofer R., *J. Chromatogr.*, **52**, 313 (1970).
173. Hoerhammer L., Wagner H., Koenig H., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **103**, 502 (1963).
174. Sun N.-C., Lang H. Y., Yao Hsueh Hsueh Pao, **11**, 101 (1964).
- 174a. Reisch J., Bornfleth H., Rheinbay J., *Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg.*, **108**, 1183 (1963).
175. Kamn G., *Arzneim.-Forsch.*, **18**, 1336 (1968).
176. Vanhaelen-Fastré R., Vanhaelen M., *J. Chromatogr.*, **129**, 397 (1976).
177. Guven K. C., Arabacioglu F., *Eczacilik Bul.*, **12**, 188 (1970).
178. Baeumler J., Rippstein S., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **107**, 1647 (1967).
179. Strickland R. D., *J. Chromatogr.*, **24**, 455 (1966).
180. Guven K. C., Ozsari G., *Eczacilik Bul.*, **8**, 206 (1966).
181. Pippenger C. E., Scott J. E., Gillen H. W., *Clin. Chem.*, **15**, 255 (1969).
182. Wad N., Hanifl E., Rosenmund H., *J. Chromatogr.*, **143**, 89 (1977).
183. Breyer U., *J. Chromatogr.*, **108**, 370 (1975).
184. Boehme H., Bitsch R., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **303**, 418 (1970).
185. Haertel G., Korhonen A., *J. Chromatogr.*, **37**, 70 (1968).
186. Deleenheer A., Sinsheimer J. E., Burckhalter J. H., *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1659 (1972).
187. Yalcindag O. N., *J. Pharm. Belg.*, **26**, 337 (1971).
188. Messerschmidt W., *J. Chromatogr.*, **39**, 90 (1969).
189. Neidlein R., Hehne E., Hahne U., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **106**, 987 (1966).
190. Probst M., Urbain M., Charlier R., *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1134 (1969).

191. *Brantner A., Vemos J.*, Int. Symp. Chromatogr. Electrophor., Lect. Pap., 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 401.
192. *Bravo Ordenes R., Hernandez-A. F.*, J. Chromatogr., 7, 60 (1962).
193. *Gecgil S.*, Eczacilik Bul., 11, 11 (1969).
194. *Guven K. C.*, Eczacilik Bul., 12, 111 (1970).
195. *Koenig H.*, Z. Anal. Chem., 246, 247 (1969).
196. *Skelly N. E., Kamke K. A.*, Anal. Chem., 39, 1009 (1967).
197. *Henry S. M., Jacobs G., Achmeteli A.*, Appl. Microbiol., 15, 1489 (1967).
198. *Kiger J. L., Kiger J. G.*, Ann. Pharm. Fr., 25, 601 (1967).
199. *Neidlein R., Horndorf E., Rosenblath J.*, Pharm. Ztg., 111, 874 (1966).
200. *Bishara R. H., Jakovljevic I. M.*, J. Chromatogr., 116, 485 (1976).
201. *Roeder E.*, Deut. Apoth.-Ztg., 107, 1007 (1967).
202. *Simard M. B., Lodge B. A.*, J. Chromatogr., 51, 517 (1970).
203. *Shroff A. P., Shaw C. J.*, J. Chromatogr., Sci., 10, 509 (1972).
204. *Wang R.-T., Tung M.-C., Hua Hsieh.*, 1970, 25; Anal. Abstr., 20, 3349 (1971).
205. *Guven K. C., Cobanlar S.*, Eczacilik Bul., 9, 98 (1967).
206. *Gawrych Z., Pomazańska T.*, Acta Pol. Pharm., 25, 39 (1968); Anal. Abstr., 16, 3233 (1969).
207. *Osborne B. G.*, J. Chromatogr., 70, 190 (1972).
208. *Lapierre C. L.*, J. Pharm. Belg., 20, 275 (1965).
209. *Maes R., Gijbels M., Laruelle L.*, J. Chromatogr., 53, 408 (1970).
210. *Smith P. J., Hermann T. S.*, Anal. Biochem., 22, 134 (1968).
211. *Guven K. C.*, Eczacilik Bul., 10, 13 (1968); Anal. Abstr., 16, 2701 (1969).
212. *Bhandari P. R., Walker H.*, J. Chromatogr., 45, 324 (1969).
213. *Datta D. D., Ghosh D., Indian J., Pharm.*, 29, 179 (1967).
214. *Steinogger E., Gebistorf J.*, Pharm. Acta Helv., 37, 343 (1962).
215. *Hoerhammer L., Wagner H., Lay B.*, Pharmazie, 15, 645 (1960).
216. *Steinogger E., Gebistorf J.*, Sci. Pharm., 31, 298 (1963).
217. *Hoerhammer L., Wagner H., Seitz M.*, Deut. Apoth.-Ztg., 103, 1302 (1963).
218. *Heusser D.*, Planta Med., 12, 237 (1964).
219. *Fassina G.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 36, 1417 (1960); Chem. Abstr., 60, 20416 (1964).
220. *Fassina G., Contessa A. R., Toth C. E.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 38, 260 (1962); Chem. Abstr., 59, 15598 (1963).
221. *Fassina G., Contessa A. R., Toth C. E.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 60, 9100 (1964).
222. *Hoerhammer L., Wagner H., Koenig H.*, Deut. Apoth.-Ztg., 103, 1 (1963).
223. *von Schantz M., Ivars L., Lindgren I., Laitinen L., Kunkkonen E., Waltenius H., Widen C. J.*, Planta Med., 12, 112 (1964).
224. *von Schantz M., Nikula S.*, Planta Med., 10, 22 (1962).
225. *Stahl E., Schorn P. J.*, Naturwissenschaften, 49, 14 (1962).
226. *von Schantz M., Ivars L., Kukkunen I., Ruuskanen A.*, Planta Med., 10, 98 (1962).
227. *Hoerhammer L., Wagner H., Bittner G.*, Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg., 108, 259 (1963).
228. *Steper H., Longo R., Korte F.*, Arch. Pharm., 296, 403 (1963).
229. *Danilović M., Naumović-Stevanović O.*, J. Chromatogr., 19, 613 (1965).
230. *Boehme H., Kreutzig L.*, Apoth.-Ztg., 103, 505 (1963).
231. *Boehme H., Kreutzig L.*, Arch. Pharm., 297, 681 (1964).
232. *Janiak B., Boehmert H.*, Arzneim.-Forsch., 12, 431 (1962).
233. *Geritsma K. W., van Rheede M. C. B.*, Pharm. Weekbl., 97, 765 (1962); Chem. Abstr., 58, 6646 (1963).
234. *Kraus L., Veprovska E.*, Cesk. Farm., 12, 515 (1963).
235. *Schmidt F.*, Deut. Apoth.-Ztg., 108, 1326 (1968).
236. *Schmidt F.*, Pharm. Ztg., 114, 1523 (1969).
237. *Jones L. N., Seidman M., Southworth B. C.*, J. Pharm. Sci., 57, 646 (1968).
238. *Kreis W., Warkentin D. L.*, Cancer Chemother. Rep., 32, 7 (1963).

239. *Ragazzi E.*, Boll. Chim. Farm., 100, 402 (1961); Chem. Abstr., 56, 10283 (1962).
240. *Guven K. C.*, Eczacilik Bul., 9, 186 (1967).
241. *Whelan F. J., Plaa G. L.*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 5, 457 (1963).
242. *Baeumler J., Brautl A. L., Obersteg J. I.*, Schweiz. Arch. Tierheilk., 106, 346 (1964).
243. *Karawya M. S., El-Keiy M. A., Wahba S. K., Kozman A. R.*, J. Pharm. Pharmacol., 20, 650 (1968).
244. *Debackere M., Laruelle L.*, J. Chromatogr., 35, 234 (1968).
245. *Siedlanowska-Krowczynska H., Janik B.*, Acta Pol. Pharm., 30, 179 (1973).
246. *Ludwikowska K., Fiebig A., Szczygiel E.*, Farm. Pol., 31, 37 (1975).
247. *Pruska-Wysocka B.*, Farm. Pol., 31, 775 (1975).
248. *Inoue T., Juniper K., Jr.*, J. Chromatogr., 42, 548 (1969).
249. *Beckstead H. D., Smith S. J.*, J. Pharm. Sci., 56, 390 (1967).
250. *Neiderhiser D. H., Fuller R. K., Hejduk L. J., Roth H. P.*, J. Chromatogr., 117, 187 (1976).
251. *Saršunová M., Hoang Ba T. T.*, Cesk. Farm., 15, 522 (1966).
252. *Olesen O. V.*, Acta Pharmacol. Toxicol., 25, 123 (1967).
253. *Ibid.*, 26, 222 (1968).
254. *Oberman Z., Chayen R., Herzberg M.*, Clin. Chim. Acta, 29, 391 (1970).
255. *Barooshlan A. V., Lautenschleger M. J., Harris W. G.*, Anal. Biochem., 49, 569 (1972).
256. *Harrison S. D., Chiu P., Jr., Maickel R. P.*, J. Chromatogr., 85, 151 (1973).
257. *Mulligan L. T., Jr., Mellett L. B.*, J. Chromatogr., 43, 376 (1969).
258. *Kłosowski S.*, Diss. Pharm., 20, 335 (1968).
259. *Bakke J. E., Feil V. J., Fjelstul C. E., Thacker K. J.*, J. Agric. Food Chem., 20, 384 (1972).
260. *Kidman S. L.*, J. Assoc. Publ. Anal., 9, 24 (1971).
261. *Clarke E. G. C., Ed.*, "Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceutical, Body Fluids and Post-Mortem Material" Pharmaceutical Press, London, 1969.
262. *Tyjihák E., Held G.*, "Thin-Layer Chromatography in Pharmacognosy", in "Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. II, A. Niederwieser G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 183.
263. *Macek K., Ed.*, "Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography", Elsevier, London, 1972.
264. *Borkowski B., Ed.*, "Chromatografia cienskowarstwowa w analizie farmaceutycznej", PZWL, Warsaw, 1973.

1. НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ  
НА ЗАКРЕПЛЕННЫХ СЛОЯХ СИЛИКАГЕЛЯ

Еще в 1953 г. Лабат и Монте [1] разделили на слоях смеси силикагель—бентонит (6:1) группу из 7 фенольных соединений, используя два различных растворителя. Вагнер [2] применял смесь кизельгура с кремневой кислотой (1:1) и 5 различных систем растворителей, в том числе ксилол, хлороформ и их смеси. Пастушка и Петрович [3, 4] хроматографировали на силикагеле G большое число фенолов (см. табл. 27.1), элюируя пробы бензолом, смесями бензол—метанол, бензол—диоксан—уксусная кислота и бензол—метанол—уксусная кислота. Пятна разделенных фенолов обнаруживали опрыскиванием диазониевой солью. В результате исследования возможности количественного определения фенолов была установлена зависимость между площадью пятна и логарифмом концентрации. На слоях силикагеля толщиной 0,3 мм эти авторы проводили непосредственное измерение оптической плотности пятен и установили ее соотношение с количеством вещества в пробе. Генсхирт и Моррианц [5] разделили на силикагеле метил- и пропил-*n*-оксибензоаты, используя как растворитель смесь пентан—уксусная кислота (22:3). Проводя количественный анализ, эти авторы элюировали пятна метанолом и измеряли поглощение элюата в УФ-области при длинах волн 220—300 нм. Точность обнаружения составляет  $\pm 2,5$ —3,0%. Петрович [6] хроматографировал изомеры ксиленола и соответствующих анилозов.

В табл. 27.1 приведены величины  $R_f$  ряда фенолов и указана окраска пятен после реакции с диазотированным бензидином.

Петрович [7, 8] исследовал компоненты каменноугольных смол, а Зеебот [9, 10] хроматографировал фенолы, находящиеся в жидких продуктах, получаемых из коксовых печей. Зеебот использовал в качестве адсорбентов силикагель и оксид алюминия и их смеси. Наилучшее разделение фенолов, получаемых при перегонке продуктов низкотемпературного коксования, достигалось на слоях, приготовленных из смеси кислого оксида алюминия и силикагеля (1:1) с добавкой 20% сульфата кальция (связующее). На этих слоях при элюировании смесью хлороформ—ацетон—диэтиламин (4:2:0,2) получены следующие величины  $R_f$ : пирокатехин 0,0, резорцин 0,34, гидрохинон 0,55,

Таблица 27.1

Величины  $R_f \times 100$  фенольных соединений, полученные на силикагеле G с различными растворителями

Фенол	Бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) а [3, 4]	Бензол—метанол—уксусная кислота (45:8:4) а [3, 4]	Бензол а [4, 6]	Бензол—метанол (95:5) а [4, 6]	Бензол—уксусная кислота (5:1) [9]	Окраска под действием диазотированного бензидина [4]
Кофейная кислота	24	43	26	52	42	Желтовато-коричневая
Пирокатехин	58	54	19	45	57	Серо-зеленая
o-Крезол			20	49		Желтая
m-Крезол			27	59		Оранжево-желтая
n-Крезол			24	51		Светло-желтая
2,3-Диметилфенол			28	58		Желтая
2,4-Диметилфенол			39	67		Светло-желтая
2,5-Диметилфенол			15	44		Коричнево-желтая
2,6-Диметилфенол			17	44		Оранжево-желтая
3,4-Диметилфенол			0	28		
3,5-Диметилфенол	70	80	5	35		
1,3-Диоксинафталин	71	66				Серо-коричневая
o,o'-Диоксибифенил	36	38				Желтая
Этилгаллат	76	61				Коричневая
Этил-m-оксибензоат	50	62				Серовато-коричневая
Этилпирокатехоат	50	58				Светло-коричневая
Феруловая кислота	18	23				Оранжевая
Галловая кислота	30	40				Красновато-коричневая
Гентизиновая кислота	83	72			63	Желтая
Гваякол	54	46			19	Коричневая
Гидрохинон	63	56				Светло-желтая
n-Оксибензальдегид	49	51				Желтая
m-Оксибензойная кислота	55	60				
n-Оксибензойная кислота						

Фенол	Бензол—диоксан—уксусная кислота (90 25 4) <sup>a</sup> [3, 4]	Бензол—метанол—уксусная кислота (45 · 8 · 4) <sup>a</sup> [3, 4]	Бензол <sup>a</sup> [4, 6]	Бензол—метанол (95 · 5) <sup>a</sup> [4, 6]	Бензол—уксусная кислота (5 · 1) [9]	Окраска под действием диазотированного бензилена [4]
Изованилин	56	47		23		Желтого-коричневая
Койевая кислота (3-окси-γ-пи-рон)	6	6				Светло-красная
Метилгептнат	71	61		60	63	Серая
α-Нафтол	81	67	28	56	58	Сине-фиолетовая
β-Нафтол	79	63	18	71		"
o-Оксибифенил	87	71	46	54		
n-Оксибифенил	76	62	21	43		
Фенол	76	60	17		70	Желтая
Флороглюцин	34	32			3	Фиолетовая
Протокатеховая кислота	32	39		6		Коричневая
Протокатеховый альдегид	32	45			15	Серо-коричневая
Пирогаллол	32	45			22	Темно-коричневая
Резорцин	56	52				Красовато-коричневая
γ-Резорциловая кислота	54	52				Ржаво-красная <sup>b</sup>
Салициловая кислота	64	68		91		Оранжевая <sup>b</sup>
Салициловый альдегид	82	83		14		"
Сиреневый альдегид	60	57				Нет окраски
Сиреневая кислота	48	60				Красовато-коричневая
Умбеллиферон	55	58				Коричневая
Ванилиновая кислота	54	61		53		Желтая
o-Ванилин	74	59		27		
Ванилин	70	64				

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 10 см.<sup>b</sup> Обнаруживающий реактив — перманганат щелочного металла.

фенол 0,74. Приведенные величины значительно отличаются от величин  $R_f$  тех же соединений, полученных на силикагеле со смесью бензол—уксусная кислота (5:1): 0,42, 0,22, 0,19 и 0,70. Для одноосновных фенолов наиболее эффективными растворителями оказались смеси петролейный эфир (60—80°C)—тетрахлорид углерода—уксусная кислота (4:6:1) и хлороформ—ацетон—диэтиламин (4:2:0,2). Многоосновные фенолы лучше всего разделялись при элюировании смесями хлороформ—уксусная кислота (5:1), хлороформ—ацетон—уксусная кислота (10:2:1) и бензол—уксусная кислота (5:1). Пятна разделенных фенолов обнаруживали опрыскиванием раствором фторбората *n*-нитробензолдиазония в ацетоне.

Зебот и Герш [11] применили этот метод для количественного определения фенолов. С этой целью они элюировали пятна 4 мл метанола и проводили реакцию с 0,1 %-ным водным раствором (2 мл) фторбората *n*-нитробензолдиазония с 2 %-ной добавкой стабилизатора — 35 %-ной фторборной кислоты. После добавления 2 мл 10 %-ного раствора ацетата натрия смеси давали отстояться в течение 5 мин, затем добавляли 10 мл 1 н. раствора гидроксида калия, доводили объем смеси до 50 мл и колориметрировали ее. Рагацци и Веронезе [12] измеряли спектрофотометрически интенсивность окраски пятен, обработанных реактивом Фолина—Сиокальте (Т-131), не проводя предварительного элюирования с адсорбента. На слоях силикагеля или целлюлозы результаты хроматографирования оказались хорошими, тогда как полиамид, по-видимому, ингибировал цветную реакцию даже в тех случаях, когда пятна можно было обнаружить с помощью указанного реагента. Ибрагим [13] применял метод флуориметрии *in situ* на слоях смеси силикагель—целлюлоза (1:1); в зависимости от типа соединения таким способом ему удавалось определить от 0,05 до 10 мкг фенолов.

Хауб и Кеммерер [14] приводят величины  $R_f$  многоядерных фенолов, полученных конденсацией *n*-крезола и формальдегида. Эти авторы проводили разделение на слоях силикагеля, высушенных при 110°C, и применяли в качестве элюирующих растворителей смеси бензол—метанол—уксусная кислота (95:2,5:2,5), бензол—метанол (3:1), хлороформ—метанол (24:1) и хлороформ—метанол—вода (95:4:1). Члены одного гомологического ряда можно было разделить методом двумерной хроматографии, элюируя пробу в разных направлениях различными растворителями. Для обнаружения пятен соединений хроматограммы опрыскивали 20 %-ным раствором пентахлорида сурьмы в тетрахлориде углерода.

Хальмекоски и Ханникайнен [15] исследовали связь между структурной гомологических фенолов и их величинами  $R_f$ ,



уделив особое внимание влиянию размера *para*-заместителя. Для большинства растворителей получены линейные соотношения между логарифмом  $R_f$  и числом углеродных атомов  $n$ . Линейность такого соотношения лучше всего выполнялась в тех случаях, когда *para*-положение занимали только атомы углерода и водорода. Величины  $R_f$  были получены при хроматографировании как на слоях силикагеля, так и на слоях полиамида. Соотношение между структурой фенолов и их величинами  $R_f$  исследовали также Пастушка и Петрович [4].

Липина [16] разделяла моно-, ди- и тригидрофенолы на силикагеле, промытом кислотой и закрепленным крахмалом. Элюирование она проводила смесью бензол—уксусная кислота—вода (2:2:1) на расстояние 15 см. Фенол, гваякол и пирокатехин были определены количественно посредством элюирования этанолом и колориметрического исследования элюата после добавления *n*-нитроанилина.

М. Нафф и А. Нафф [17] изучали разделение методом ТСХ на микрохроматографических пластинках со слоями силикагеля 7 известных фенолов. С растворителем, представлявшим собой смесь толуола и диоксана (25:4), получены следующие величины  $R_f$ : *o*-нитрофенол 0,73, *o*-фенилфенол 0,60, *m*-крезол 0,53, *m*-нитрофенол 0,45, *o*-оксибензальдегид 0,30, резорцин 0,23 и флороглюцин 0,07.

Шульц и др. [18] сравнили результаты разделения фенолов и органических пероксидов на образцах силикагеля с различным диаметром пор. Наилучшие результаты получены на силикагеле с размером пор от 20 до 50 Å при элюировании смесью бензол—уксусная кислота (5:1).

Авторы работы [19] нашли, что диоксинафталины лучше всего разделять на силикагеле с удельной поверхностью 565 м<sup>2</sup>/г.

Детерс [20] использовал кислый силикагель с хлороформом в качестве подвижной фазы для качественного и количественного анализа пентахлорфенола; слой силикагеля он предварительно обрабатывал 0,05 н. щавелевой кислотой. Чтобы оценить количественно содержание пентахлорфенола, пятна элюировали с хроматограммы и измеряли поглощение элюата в УФ-области спектра. Фурукава [21] разделил смесь фенолов на хроматографических полосках с кислым силикагелем. Хусайн [22] хроматографировал на тонких слоях силикагеля G группу из 23 хлорпроизводных крезолов и ксиленолов. При этом были исследованы различные системы растворителей, лучшей из них оказался ксилол, насыщенный формамидом. *n*-Хлоркрезолы не удалось отделить от исходных крезолов, а 6-хлор-2-метилфенол не удалось отделить от 4,6-дихлор-2-метилфенола. Этот метод применялся для того, чтобы проследить за ходом хлорирования 2,5-диметилфенола газообразным хлором в среде тетрахлорида

углерода. Чтобы обнаружить пятна, хроматограмму опрыскивали раствором фосфовольфрамомолибденовой кислоты и выдерживали затем в парах аммиака. Хлорированные фенолы обнаруживаются в виде синих пятен на белом фоне. Количественно эти соединения определяли методом прямой денситометрии [23].

Лихеновые кислоты исследовали на пластинках с силикагелем, подкисленным щавелевой кислотой [24]. Элюировали эти соединения смесью бензол—хлороформ (1:1) в камере с насыщенной атмосферой. В указанных условиях получены следующие величины  $R_f$ : усниновая кислота 0,65, вульпининовая кислота 0,80 и эверновая кислота 0,11. Бахман [25] использовал силикагель и смесь бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) для разделения лихеновых кислот группы β-осина, полученных из *Parmelia*. Он приводит следующие величины  $R_f$  этих соединений: атранорин 0,71, псоромининовая кислота 0,45, тамноловая кислота 0,42, цетрарин 0,25, фумаропроцетрариновая кислота 0,10, норстиктовая кислота 0,47, салазиновая кислота 0,12, стиктовая кислота 0,34 и α-метоксисалазиновая кислота 0,18. Для обнаружения пятен Бахман применял ряд реактивов, в том числе 10 %-ный раствор бихромата натрия, 1 %-ный раствор хлорида железа (III) и 3,3 %-ный раствор перманганата калия в серной кислоте. Рамо [26, 27] использовал такую же хроматографическую систему для разделения этих соединений и нашел, что процетрариновая кислота характеризуется той же величиной  $R_f$ , что и фумаропроцетрариновая кислота; хотя у норстиктовой кислоты такая же величина  $R_f$ , что и у тамноловой, последнюю можно отличить по сильной желто-зеленоватой флуоресценции.

Кониши и Кано [28] опубликовали работу по качественному и количественному анализу нонилфенольных изомеров. Сопкина и Рябов [29] анализировали методом ТСХ дифенолы, а Венкерт и др. [29а] опубликовали данные по фенолам, содержащимся в пшеничных отрубях. Стамбули и Парис [29б] хроматографировали продукты гидролиза трех гетерозидов: скопарозид, цитизозид и афлоиозид.

Авторы работы [30] хроматографировали группу синтетических дубильных веществ, используя смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) для элюирования в одном направлении и смесь *n*-бутанол—этанол—аммиак—вода (75:10:15:10)—в другом. Пятна становились видимыми при УФ-облучении. Мурко и Янкович [31] разделяли промышленные дубильные вещества смесью этилацетат—хлороформ—муравьиная кислота (4:5:1). Фиш и Кирк [32] анализировали методом двумерной ТСХ полифенолы, содержащиеся в папоротниках *Dryopteris*. Оптимальное разделение достигалось на слоях силикагеля G,

приготовленных с буферным раствором лимонной кислоты и фосфата (рН 6,0), к которому добавляли 150 мг аскорбиновой кислоты, чтобы предотвратить окисление неустойчивых полифенолов. Элюентами служили смеси петролейный эфир (40—60°C)—этанол (95:5) в одном направлении и циклогексан—этилацетат (1:1) в другом направлении. Пятна соединений обнаруживаются при облучении УФ-светом, кроме того, их можно обнаружить обработкой красителем прочный синий В (реактив Т-115).

Ван Сумере и др. [33] опубликовали значения  $R_f$  93 фенолов и кумаринов, полученные на слоях силикагеля и смеси силикагель—целлюлоза (1:1) при элюировании смесями толуол—этилформиат—муравьиная кислота (5:4:1) и хлороформ—уксусная кислота—вода (4:1:1). Предварительная обработка слоев адсорбента водяным паром улучшает разделение некоторых соединений. В работе указан также цвет пятен, наблюдаемый при обработке хроматограмм диазотированным *n*-нитроанилином (реактив Т-180); на слоях со смешанным адсорбентом цветная реакция шла лучше. Грант и Уэттер [34] хроматографировали содержащиеся в *Lotus* вторичные фенольные соединения на слоях силикагеля, полиамида и целлюлозы с 30 различными растворителями. На целлюлозе и полиамиде разделение оказалось неудовлетворительным; лучшие результаты получены на силикагеле при сочетании многократного и двустадийного элюирования: пробу элюировали сначала дважды смесью циклогексан—этилацетат (1:1) на расстояние 15 см, затем смесью метанол—хлороформ (3:7) на расстояние 7,50 см.

Ваксмундзий и Манько [35] разделили 10 фенольных соединений на пропитанном формамидом силикагеле, элюируя пробу смесью бензол—метанол (95:5). Тилеман [36—38] хроматографировал фенолы на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле, используя в качестве элюирующих растворителей бензол, смеси бензол—этилацетат (3:2), дихлорметан—этилацетат (3:2), дихлорметан—этилацетат—диэтиламин (92:5:3) и бензол—метанол—уксусная кислота (8:1:1). *o*- и *n*-Диоксибензолы окислялись нитратом серебра до соответствующих хинонов. Джесснер и Акара [39] разделяли изомерные моонитрофенолы на слоях силикагеля, обработанных 0,1 М раствором карбоната натрия; элюентом служила смесь диэтиловый эфир—петролейный эфир (5:3). На обработанном силикагеле выходы нитрофенолов были достаточно хорошими—от 93 до 110 % (т. е. ~100 %), а на необработанном—80—90 %. Парихар и др. [40] разделили ряд полинитрофенолов на необработанном силикагеле и на силикагеле, обработанном буферным раствором, используя 4 растворителя. Клиффорд и др. [41] хроматографировали большое число соединений гомологиче-

ского ряда 2- и 4-алкилзамещенных 2,6-динитрофенолов на силикагеле G смесью петролейный эфир (40—60°C)—эфир—муравьиная кислота (45:5:1). При этом были изучены структурные соотношения. Ноувт и Вейнгартен [42] привели величины  $R_f$  20 нитрофенолов, полученные на силикагеле с бензолом и дибутиловым эфиром.

О разделении фенольных компонентов гашиша см. в гл. XXVI, разд. 3.

## 2. НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НА НЕЗАКРЕПЛЕННЫХ СЛОЯХ СИЛИКАГЕЛЯ

Янак [43] использовал для разделения фенольных соединений незакрепленные слои силикагеля. Он применял при хроматографировании однокомпонентные растворители—*n*-гексан,

Таблица 27 2

Величины  $R_f \times 100$  некоторых замещенных фенолов, полученные на незакрепленных слоях оксида алюминия<sup>a</sup> с различными растворителями [44, 45]

Фенол	Дихлорэтан	Дихлорметан	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Бензол—пирдин (9:1)	Бензол—пирдин (4:1)	Изопрониловый эфир	Тетрагидрофуран
<i>o</i> -Нитрофенол	9	20	30	5	6	9	21	63
<i>o</i> -Нитро- <i>n</i> -бромфенол	2	5	9	0	1	1	3	3
<i>o</i> -Нитро- <i>n</i> -оксифенол	1	2	4	5	7	17	38	80
<i>o</i> -Нитро- <i>n</i> -метоксифенол	11	24	30	16	12	18	32	77
<i>o</i> -Нитро- <i>n</i> -метилфенол	10	27	32	20	12	19	35	78
<i>o,n</i> -Динитрофенол	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>m</i> -Нитрофенол			5	10			44	
<i>n</i> -Нитрофенол			3	3			15	
<i>o</i> -Аминофенол			7	4				
<i>m</i> Аминофенол			28	27				
<i>n</i> -Аминофенол			37	33				

<sup>a</sup> Активность по Брокману—III.

бензол и хлороформ, а для обнаружения пятен соединений пользовался насыщенным раствором тетрацианэтилена в бензоле. После обработки окрашивающим реактивом (проводить ее необходимо осторожно, чтобы не повредить слой адсорбента) пластинку нагревали при 100°C до появления окраски.

Германек и др. [44, 45] анализировал фенолы на незакрепленных слоях оксида алюминия. Величины  $R_f$  некоторых замещенных фенолов даны в табл. 27.2 (см. также в гл. XXX, разд. 3, данные о разделении фенольных альдегидов). Шаршунова и Шварц [46] также применяли незакрепленные слои кислого оксида алюминия (степень активности V) для разделения и идентификации фенолов, используемых в медицинской практике.

### 3. НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НА СЛОЯХ ПОЛИАМИДА

Полиамид представляет собой исключительно эффективный адсорбент для разделения фенолов, причем его эффективность обусловлена образованием водородных связей между фенольными соединениями и амидными группами полимера [47]. Уанг и др. [48—50] пользовались полиамидными слоями, полученными из раствора полиамида в муравьиной кислоте (о способе приготовления таких слоев см. в гл. III, разд. 4). В табл. 27.3 приведены величины  $R_f$ , полученные при разделении различных фенолов на таких полиамидных слоях. Уанг и Лин [49], а также Лин и др. [50] использовали этот метод для разделения некоторых природных фенольных соединений. Хальмекоски и Ханникайнен [15] применяли слои полиамида при изучении зависимости между величиной  $R_f$  и числом углеродных атомов в *пара*-замещенных фенолах пяти гомологических рядов. Эти авторы использовали 12 различных растворителей. Штадлер и Эндрес [51] исследовали фенолы растительных дубильных экстрактов (см. также гл. XXXII, разд. 3, о разделении фенольных антиоксидантов хроматографированием на полиамидных слоях). Гштирнер и Флах [52] исследовали дубильные вещества из *Rhizoma rhei*, применяя в качестве растворителей метанол и ацетон с добавкой различных количеств воды. Мозель и Герман [53] хроматографировали с растворителями того же типа 11 фенолов, содержащихся в растениях.

Грау и Эндрес [54] анализировали группу хинонов, гидрохинонов и фенолов на ацетилированном полиамиде, используя для элюирования смеси метанола или ацетона с водой. Этот адсорбент был выбран авторами потому, что при хроматографировании на необработанных слоях полиамида происходило необратимое связывание некоторых хинонов. Ацетилирование полиамида проводили по методу Грассмана и др [55]. Оно мало

Таблица 27.3

Величины  $R_f \times 100$  фенолов, полученные на слоях полиамида, осажденных из раствора [48]

Фенол	Бензол	Хлороформ	Этилацетат
Фенол	16	18	75
o-Крезол	30	37	81
m-Крезол	21	30	78
p-Крезол	21	32	78
o-Изопропилфенол	43	47	85
и Изопропилфенол	36	42	81
p-Изопропилфенол	33	39	78
Тимол	64	57	87
$\alpha$ -Нафтол	14	12	71
$\beta$ -Нафтол	12	10	68
Гидрохинон	0	2	50
Резорцин	0	0	29
Пирокатехин	0	0	32
Пирогаллол	0	0	20
Флороглюцин	0	0	4
Орсин	0	0	32
m-Хлорфенол	12	9	72
p-Хлорфенол	13	10	74
m-Бромфенол	12	9	7
p-Бромфенол	13	12	70
p-Иодфенол	13	11	70
o-Нитрофенол	100	100	100
p-Нитрофенол	2	3	51

влияет на адсорбцию фенолов. Вагнер и др. [56] также отметили отсутствие такого влияния.

Сочевиньский и Шумило [57, 58] хроматографировали 33 фенольных соединения в различных растворителях с тем, чтобы исследовать влияние структуры соединений на адсорбцию на полиамиде. Барк и Грэм [59], а также Грэм [60] хроматографировали большое число нитрофенолов для выяснения структурных эффектов. Грэм и др [61] нашли, что 100 %-ное извлечение *m*- и *p*-нитрофенолов из слоя полиамида невозможно. Барк

и Грэм [62], изучая влияние алкильных, арильных и алкокси-групп на хроматографическое поведение фенолов, применяли в качестве элюирующих растворителей смесь циклогексана и уксусной кислоты (93:7) и 10 %-ную уксусную кислоту. Адсорбентом служила целлюлоза, пропитанная полиамидом. Адсорбционные слои приготавливали смешиванием 11 мл раствора полиамида (0,13 г нейлона/мл) в 90 %-ной муравьиной кислоте с 13,5 г целлюлозы и 74 мл муравьиной кислоты. В статье [62] указаны величины  $R_f$  76 соединений. Те же растворители применяли и для разделения нитрофенолов [59]. Для элюирования нитрофенолов использовали также смеси бутанол—5 н. раствор аммиака (100:33), пропанол—вода—27 %-ный аммиак (8:1:1), а также бутанол—этанол—27 %-ный аммиак [63]. На слое, приготовленном смешением 12 г полиамида с 2,4 г целлюлозы, получены такие же величины  $R_f$ , что и на чистом полиамиде [56]. Даймонд [63а] разделял на полиамиде *n*-алкилфенолы с длинной цепи от  $C_1$  до  $C_{12}$ , элюируя пробу смесями вода—диметилформамид—формамид (6:4:1) и 1 н. раствор гидроксида натрия—метанол (7:3).

#### 4. РАЗДЕЛЕНИЕ НА ИОНООБМЕННЫХ СЛОЯХ

Шерма и Худ [64] хроматографировали смесь шести фенолов на слоях ионообменной смолы, закрепленной крахмалом. Толщина этих слоев равнялась 0,3 м, потому что более толстые слои могут растрескиваться, а добиться однородности более тонких слоев трудно. После нанесения слоя пластинки выдерживали 15 мин, а затем помещали в штатив для хранения. Слои приготавливали из ионообменных смол «дауэкс 50W-X8» ( $H^+$ ), «дауэкс 50W-X8» ( $NH_4^+$ ) и «дауэкс 1-X4» ( $Cl^-$ ) с водными растворами метанола, концентрация которых менялась от нуля до 8 моль/л. Наилучшее разрешение получено на слоях смолы «дауэкс 50W-X8» ( $H^+$ ) с более высокими концентрациями метанола, хотя воспроизводимость результатов лучше при более низких концентрациях его. Из числа испытанных обнаруживающих реактивов наиболее подходящим признан раствор диазотированного бензидина. Лепри и др. [65] привели величины  $R_f$  58 фенолов, определенные на «дауэксе 50-X4» ( $H^+$ ) с водой и смесями вода—этанол (4:1 и 1:2), а также на рексине 102 ( $H^+$ ) производства Fisher Scientific со смесью 0,5 М соляная кислота—этанол (4:1). Величины  $R_f$  получены также при хроматографировании на «дауэксе 50-X4» ( $Na^+$ ) в следующих шести растворителях: 0,1 М ацетатный буферный раствор, 0,1 М раствор бикарбоната натрия, 0,05 М раствор карбоната натрия, 1 М раствор аммиака, смеси 1 М раствор аммиака—0,1 М раствор ацетата натрия и 1 М раствор аммиака—1 М раствор ацетата

натрия. Те же авторы [66] исследовали разделение этой группы соединений на PEI- и DEAE-целлюлозе и ионообменной смоле AG3-X4A (производства BIO-Rad Labs). В качестве растворителей при хроматографировании на AG3-X4A в  $OH^-$ -форме использовали 50 %-ный и 95 %-ный метанол, 0,5 М растворы аммиака в 50 %-ном и 95 %-ном этаноле, а также смесь циклогексан—уксусная кислота (93:7), а при хроматографировании на этой же смоле в  $Cl^-$ -форме растворителем служил 95 %-ный метанол. На PEI-целлюлозе разделение вели водой, смесью вода—метанол (1:4), 0,1 М раствором бикарбоната натрия и смесью уксусная кислота—циклогексан (7:93). В некоторых случаях для улучшения разрешения применяли многократное и двумерное элюирование. Те же соединения хроматографировали также на ионообменной смоле AG1-X4 и на бензоилированной DEAE-целлюлозе (BD-целлюлоза производства Serva) [67]. При разделении на смоле AG1-X4 в  $Cl^-$ -,  $CH_3COO^-$ - и  $OH^-$ -формах применяли в качестве элюента метанол. На ацетатной форме этой смолы использовали как растворители также 10 М и 1 М растворы уксусной кислоты в метаноле. При хроматографировании на BD-целлюлозе растворителями служили вода, смеси вода—метанол (4:1, 1:1 и 3:7), метанол, 1 М и 3 М растворы уксусной кислоты.

#### 5. РАЗДЕЛЕНИЕ НА ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Разделение фенолов на тонких слоях целлюлозы рассматривается в ограниченном числе статей. Бартон [68] провел разделение как на силикагеле, так и на целлюлозе и нашел, что предпочтителен первый адсорбент. Для разделения 36 соединений на микрокристаллической целлюлозе он использовал в качестве растворителя 2 %-ную уксусную кислоту. Обнаруживающим реактивом служила диазотированная сульфаниловая кислота (реактив Т-249). Дитман [69] хроматографировал 37 фенолов и фенолокислот на слоях целлюлозы MN 300 смесями этилацетат—*n*-пропанол—25 %-ный аммиак (3:5:2) (двукратное элюирование на расстояние 10 см), амиловый спирт—муравьиная кислота—вода (20:20:1), *n*-пропанол—вода (13:7) и *n*-гептан—тетрахлорид углерода—метанол (7:4:3). Только с последним растворителем разделение велось в насыщенной атмосфере. Янгаард [70] разделял на листках целлюлозы MN-polygram SE300 71 фенольное соединение растительного происхождения, используя как элюирующие растворители 2 %-ный раствор муравьиной кислоты, 20 %-ный раствор хлорида калия, 10 %-ную уксусную кислоту и смесь изопропанол—аммиак—вода (8:1:1). Если содержание анализируемого соединения составляет от 0,2 до 1,0 мкг, их можно обнаружить, опрыскивая

хроматограмму диазотированным *n*-нитроанилином (реактив Т-180) или сульфаниловой кислотой (реактив Т-249).

Дасс и Уивер [71] также хроматографировали 55 фенольных соединений растительного происхождения на целлюлозе MN 300 и микрокристаллической целлюлозе, используя следующие три системы растворителей: вода—муравьиная кислота (98:2), *n*-амиловый спирт—уксусная кислота—вода (10:6:5), а также бензол—пропионовая кислота—вода (4:9:3). Авторы приводят цветные реакции с шестью обнаруживающими реактивами. Халук и др. [72] использовали для разделения фенолокислот смеси *n*-бутанол—пиридин—вода (14:3:3), метилэтилкетон—вода—диэтиламин (921:77:2) и 30%-ную уксусную кислоту. Они применяли также двумерное разделение, причем сначала элюировали пробу 30%-ной уксусной кислотой, а затем проводили уже в другом направлении электрофорез при напряжении 1500 В и токе 30 мА, используя буферный раствор (рН 5,3), представлявший собой смесь пиридин—уксусная кислота—вода (5:2:493). Йошек и Мюллер [73] хроматографировали 44 фенола на целлюлозе 300 GF<sub>254</sub> со смесью бензол—метанол—уксусная кислота (35:4:2) (двукратное элюирование) и нижней фазой смеси бензол—*n*-бутанол—вода (9:1:10).

Фенолы разделили также на пропитанных слоях целлюлозы. Как реагенты для пропитки использовались формамид, *N*-метилформамид и *N,N*-диметилформамид, а как элюирующий растворитель — гексан [61, 74—76].

Распределительная хроматография с обращенными фазами применялась для разделения алкилфенолов [77, 78], галогенированных фенолов и галогенированных алкилзамещенных фенолов [79]; неподвижной фазой при этом служил этилолеат, а подвижные фазы представляли собой смеси этанол—вода в соотношениях 1:3; 1:9; 3:7 и 3,75:6,25.

## 6. РАЗДЕЛЕНИЕ НА ПРОЧИХ АДСОРБЕНТАХ

Барк и Грэм провели разделение на оксиде алюминия галогенированных фенолов, галогенированных алкилфенолов [80], алкилфенолов [81] и нитрофенолов [82], элюируя пробы циклогексаном, смесью циклогексан—диоксан (1:1), диоксаном, смесью бензол—метанол (95:5), смесями бензол—этанол (95:5) и бензол—этилацетат (3:7). Сривастава и Дуа [83] разделяли на слое, приготовленном смешением оксида алюминия с гидроксидом калия (2:1), фенол, *o*-, *m*- и *p*-крезолы, *o*-, *m*- и *p*-хлорфенолы и салициловый альдегид, используя как растворители хлороформ или смесь бензол—метанол (9:1). Гидрохинон, *o*-, *m*- и *p*-нитрофенолы, резорцин, пирокатехин, *o*-, *m*- и *p*-аминофенолы и пирогаллол анализировали на слоях смеси карбоната цинка и

силикагеля (3:2) с помощью таких растворителей, как смеси бензол—этилацетат (9:1) или бензол—метилэтилкетон (9:1).

## 7. РАЗДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Пастушка и Тринкс [84, 85] применили электрофорез для разделения некоторых нафтолов, фенолов и фенолокарбоновых кислот. Для разделения фенолов они использовали два типа адсорбционных слоев. Слой силикагеля предварительно обрабатывали 3%-ным раствором борной кислоты и на них проводили электрофорез с электролитом, представлявшим собой смесь 80 мл этанола, 30 мл воды, 4 г борной кислоты и 2 г кристаллического ацетата натрия. Добавляя уксусную кислоту, доводили рН подвижной фазы до 4,5 и элюировали пробу примерно 90 мин при напряженности поля 20 В/см и общей разности потенциалов 400 В. Разделение на слоях кизельгура G, также обработанного 3%-ным раствором борной кислоты, проводили с тем же раствором электролита, но рН его доводили до 5,5 добавлением уксусной кислоты. В рассматриваемых работах указана длина пути элюирования 36 фенольных соединений, отнесенная к *m*-оксибензойной кислоте, принятой за стандарт.

Халук и др. [72] использовали целлюлозу, силикагель, полиамид и гель полиакриламида в качестве субстратов при электрофорезе 25 фенольных кислот. Буферным раствором для полиакриламида служила смесь пиридин—уксусная кислота—вода (5:2:493) (рН 5,3); напряжение составляло 1400 В и сила тока 40 мА. На силикагеле и полиамиде проводили двумерное разделение: хроматографию в одном направлении и электрофорез во втором. Для разделения соединений ряда бензойной кислоты применяли смесь этилацетат—уксусная кислота (95:5) при хроматографировании на полиамиде и буферный раствор Аронссона (рН 8,9) при электрофорезе при напряжении 1800 В и токе 40 мА; для соединений ряда коричной кислоты буферным раствором служила смесь пиридин—уксусная кислота—вода (1:6:90) (рН 3,55) при токе в 20 мА (об условиях разделения на целлюлозе см. в разд. 5 этой главы). Уокер и Томпсон [86] также пользовались целлюлозой в качестве неподвижной фазы для электрофореза фенолов с буферными растворами с рН 5,3 или 9,1 при напряженности поля 60 В/см. Чтобы улучшить разделение, под прямым углом к направлению электрофореза проводили хроматографирование.

## 8. РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛОВ

Донт и де Роой [87] исследовали спирты и фенолы, улетучивающиеся с паром из пищевых продуктов. Хроматографировали эти фенолы в виде 3,5-динитробензоатов. Чтобы можно

было получить производные фенолов, необходимо сконцентрировать те малые их количества, которые улетучиваются с паром, и отделить их от обычно присутствующих в больших количествах метанола и этанола. С этой целью дистиллят экстрагируют пентаном. Полученные производные хроматографируют на силикагеле G, активированном при 110—120°C в течение 15 мин, элюируя пробу смесью бензол—легкий петролейный эфир (1:1). По окончании разделения пластинки опрыскивают 1%-ным раствором 1-нафтиламина, в результате чего на них появляются пятна с окраской от желтой до оранжевой. Члены одного гомологического ряда таким способом разделить не удается.

Реакция азосочетания, которая применяется для обнаружения фенолов на тонкослойных хроматограммах, пригодна также для получения производных фенолов до проведения хроматографического разделения. Кнаппе и Родевальд [88] анализировали производные, полученные при обработке фенольных соединений прочной красной солью, представляющей собой хлорид 1-антрахинондиазония. Для разделения фенола, трех крезолов и шести ксиленолов потребовались три хроматографические системы. Основное разделение этих соединений проводили на силикагеле G, обработанном карбонатом калия; элюентом при этом служила смесь дихлорметан—этилацетат—диэтиламин (92:5:3). Фенол, 3,5-ксиленол и *m*-крезол разделяли на том же адсорбенте смесью хлороформ—этилацетат—этанол (93:5:2). Чтобы разделить 3,4-ксиленол, *n*-крезол и 2,4-ксиленол, необходим кислый силикагель (30 г силикагеля G и 60 мл 0,5 н. раствора щавелевой кислоты). В этом случае в качестве элюирующего растворителя использовался бензол. Тилеман [89] разделил 1- и 2-нафтолы в виде производных этого же красителя, элюируя пробу растворителем, содержащим диэтиламин (см. выше), но с соотношением компонентов 92:3:3. Производные *o*-, *m*- и *n*-нитро-, 2,4-динитро- и 2,4-тринитрофенолов разделяли, элюируя бензолом [90]. Для разделения фенольных соединений также использовались их производные, полученные связыванием фенолов с прочной солью ВВ [91—93]. Анализ вели на слоях смеси силикагель G—карбонат калия (1:2) со следующими системами растворителей: дихлорметан—этилацетат—диэтиламин (92:5:3), дихлорметан—хлороформ—бензол—этилацетат (88:5:5:2) или дихлорметан—бензол (1:1). Тилеман [94] привел величины  $R_f$  производных 1- и 2-нафтола и 8 различных красителей типа прочной соли. Смит и Салливан [95] определяли содержание фенолов в конденсате сигаретного дыма. С этой целью они получали *n*-нитрофенилазопроизводные фенолов и анализировали их на кизельгуре G, пропитанном 5%-ным раствором формамида в ацетоне, элюируя пробу смесями бензол—циклогексан—дипропиленгликоль и бен-

зол—циклогексан—диэтиламин. Если необходимо было количественное определение, пятна элюировали раствором аммиака (уд. масса 0,88) и определяли поглощение элюата на спектрофотометре. Крамп [96] использовал двумерное хроматографирование для разделения 20 алкилфенолов в виде их производных с *n*-нитрофенольными азокрасителями. Разделение проводилось на силикагеле, пропитанном 0,5 н. раствором гидроксида натрия, при элюировании смесями хлороформ—ацетон (9:1) в одном направлении и бензол—дипропиламин (4:1) — в другом. Величины  $R_f$  некоторых производных фенолов даны в табл. 27.4.

Таблица 27.4  
Величины  $R_f \times 100$  диазониевых производных фенолов, полученные на различных хроматографических системах<sup>а, б</sup>

Исходный фенол	А		Б	В			
	а	б	в	г	д	е	ж
Фенол	7	37	0 <sup>в</sup>	30	23		
3,5-Ксиленол	17	44	0	56	75		
<i>m</i> -Крезол	18	51	0	53	39		
<i>o</i> -Крезол	35	> 57	0	61	44		
2,3-Ксиленол	60	> 57	< 14	71	70		
2,5-Ксиленол	66	> 57	< 14	74	50		
2,6-Ксиленол	78	> 57	< 14	85	30		
3,4-Ксиленол	83	> 57	20	100	90—100	23	50
<i>n</i> -Крезол	83	> 57	36	100	90—100	15	30
2,4-Ксиленол	85	> 57	47	100	90—100	53	85
Гваякол				90	100		
<i>o</i> -Этилфенол				64	64		
<i>m</i> -Этилфенол				68	54		
<i>n</i> -Этилфенол				100	90—100	15	50

<sup>а</sup> Адсорбенты: А — щелочной силикагель G (30 г силикагеля + 60 мл 0,5 н. раствора  $K_2CO_3$ ) [88]; Б — кислый силикагель G (30 г силикагеля + 60 мл 0,5 н. щавелевой кислоты) [88]; В — кизельгур G, пропитанный 5%-ным раствором формамида в ацетоне [95]. Элюирующие растворители: а — дихлорметан—этилацетат—диэтиламин (92:5:3), разделение в насыщенной атмосфере; б — хлороформ—этилацетат—этанол (93:5:2), разделение в насыщенной атмосфере; в — бензол; г — бензол—циклогексан—дипропиленгликоль (30:70:3); д — бензол—циклогексан—диэтиламин (5:5:1); е — циклогексан—диэтиламин (9:1); ж — циклогексан—бензол—диэтиламин (7:3:1).

<sup>б</sup> Производные фенолов: на слоях А и Б — 1-антрахиноназопроизводные; на слое В — *n*-нитроанилиназопроизводные.

<sup>в</sup> Остаются на линии старта.

Хурачек и др. [97] хроматографировали *n*-(N, N-диметил-амино)бензол-*n'*-азобензоаты 22 фенольных соединений. Они опубликовали величины  $R_f$ , полученные на силикагеле со следующими растворителями: хлороформ, смеси бензол—хлороформ (1:1), гексан—этилацетат (4:1), циклогексан—этилацетат (4:1) и циклогексан—метилэтилкетон (7:3). Кондо и Каваширо [98] хроматографировали на силикагеле *n*-нитробензолдиазонийфторбораты нескольких фенолов смесями циклогексан—изопропиловый эфир—хлороформ (7:1:7), а также циклогексан—хлороформ (1:1). Рено и Картрон [99] разделили на слоях силикагеля, обработанных 1 н. раствором гидроксида натрия, некоторые производные фенолов, *o*- и *m*-крезолов, а также ксиленолов, не замещенных в положении 4, элюируя их смесью бензол—метанол (9:1). Производные *n*-крезола и ксиленолов, замещенных в положении 4, разделяли на обработанных 0,1 н. раствором гидроксида натрия слоях силикагеля, элюируя смесью трихлорэтилен—дифениламин (39:1). Вильденхайн и Хензеке [100] разделили 31 динитрофенильный эфир фенольных соединений на слоях силиката магния, используя следующие смеси растворителей: бензол—хлороформ (1:1), циклогексан—циклогексанол (75:10 и 1:1), циклогексан—циклогексанол—уксусная кислота (50:5:2), бензол—диэтиловый эфир (2:1), бензол—анилин (97:3) и бензол—пропиламин (99:1). В работе [101] описано разделение 4-ацетил-2-нитрофениловых эфиров 23 таких фенолов, а также 17 продуктов присоединения на слоях силикагеля G и полиамида со смесями циклогексан—циклогексанон (3:1) и дихлорметан—циклогексан (5:1) [101].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Labat L., Montes A. L., An. Asoc. Quim. Arg., **41**, 166 (1953); Chem. Abstr., **48**, 3637 (1954).
2. Wagner G., Pharmazie, **10**, 302 (1955).
3. Pastuska G., Z. Anal. Chem., **179**, 355 (1961).
4. Pastuska G., Petrowitz H.-J., Chem.-Ztg., **86**, 311 (1962).
5. Gaenshirt H., Morianz K., Arch. Pharm., **293/65**, 1065 (1960).
6. Petrowitz H.-J., Erdoel Kohle, **14**, 923 (1961).
7. Petrowitz H.-J., Mitt. Dtsch. Ges. Holzforsch., **48**, 57 (1961).
8. Petrowitz H.-J., Materialpruefung, **2**, 309 (1960).
9. Seeboth H., Chem. Tech. (Berlin), **15**, 34 (1963).
10. Seeboth H., Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, **5**, 693 (1963).
11. Seeboth H., Goersch H., Chem. Tech. (Berlin), **15**, 294 (1963).
12. Ragazzi E., Veronese G., J. Chromatogr., **77**, 369 (1973).
13. Ibrahim R. K., J. Chromatogr., **42**, 544 (1969).
14. Haub H.-G., Kaemmerer H., J. Chromatogr., **11**, 487 (1963).
15. Halmekoski J., Hannikainen H., Suom. Kemistil., **36B**, 24 (1963).
16. Липина Т. Г., Труды по химии и хим. технол., **1962**, № 2, 424.

17. Naff M. B., Naff A. S., J. Chem. Educ., **40**, 534 (1963).
18. Schulz M., Seeboth H., Wieker W., Z. Chem., **2**, 279 (1962).
19. Waksmundzki A., Rózylo J., Chem. Anal. (Warsaw), **14**, 1217 (1969).
20. Deters R., Chem.-Ztg., **86**, 388 (1962).
21. Furukawa T., Nippon Kagaku Zasshi, **80**, 387 (1959); Chem. Abstr., **54**, 13938 (1960).
22. Husain S., J. Chromatogr., **18**, 419 (1965).
23. Husain S., Swaroop P. A., J. Chromatogr., **22**, 180 (1966).
24. Stahl E., Schorn P. J., Z. Physiol. Chem., **325**, 263 (1961).
25. Bachmann O., Oesterr. Botan. Z., **110**, 103 (1963).
26. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 97 (1963).
27. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 316 (1963).
28. Konishi K., Kano Y., Bunseki Kagaku, **13**, 1227 (1964).
29. Conkuna A. K., Рябов В. Д., Журн. анал. хим., **19**, 615 (1964).
- 29a. Wenkert E., Loeser E. M., Mahapatra S. N., Schanker F., Wilson E. M., J. Org. Chem., **29**, 435 (1964).
- 29b. Stambouli A., Paris R. R., Ann. Pharm. Fr., **19**, 435 (1961).
30. Aurenge J., Barbe-Richaud G., Gelpi L., J. Chromatogr., **22**, 369 (1966).
31. Murko D., Janković M., Kem. Ind. (Zagreb), **18**, 730 (1969).
32. Fish R., Kirk W. R., J. Chromatogr., **36**, 383 (1968).
33. Van Sumere C. F., Wolf G., Teuchy H., Kint J., J. Chromatogr., **20**, 48 (1965).
34. Grant W. F., Whetter J. M., J. Chromatogr., **21**, 247 (1966).
35. Waksmundzki A., Maňko R., "The Separation of Phenols on Formamide-Impregnated Silica Gel", in "Int. Symp. Chromatogr., 2nd", K. Macek, I. M. Hais, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 221.
36. Thielemann H., Z. Chem., **12**, 223 (1972).
37. Thielemann H., Mikrochim. Acta, **1972**, 672.
38. Thielemann H., Mikrochim. Acta, **1972**, 718.
39. Gessner T., Acara M., Anal. Biochem., **35**, 442 (1970).
40. Parihar D. B., Sharma S. P., Tewari K. C., J. Chromatogr., **24**, 230 (1966).
41. Clifford D. R., Fieldgate D. M., Watkins D. A. M., J. Chromatogr., **43**, 110 (1969).
42. Nowot J., Weingarten D., Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., 4th, 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 168.
43. Janák J., J. Chromatogr., **15**, 15 (1964).
44. Hermánek S., Schwarz W., Čekan Z., Pharmazie, **16**, 566 (1961).
45. Hermánek S., Schwarz W., Čekan Z., Collect. Czech. Chem. Commun., **28**, 2031 (1963).
46. Saršunová M., Schwarz V., Pharmazie, **17**, 527 (1962).
47. Hoerhammer L., Wagner H., Pharm. Ztg., **104**, 783 (1959).
48. Wang K.-T., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), **8**, 241 (1961).
49. Wang K.-T., Lin Y.-T., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), **10**, 146 (1963).
50. Lin Y.-T., Wang K.-T., Lin Y.-S., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), **9**, 68 (1962); Chem. Abstr., **58**, 9412 (1963).
51. Stadler P., Endres H., J. Chromatogr., **17**, 587 (1965).
52. Gstirner F., Flach F., Arch. Pharm. (Weinheim), **303**, 339 (1970).
53. Mosel H.-D., Herrmann K., J. Chromatogr., **87**, 280 (1973).
54. Grau W., Enders H., J. Chromatogr., **17**, 585 (1965).
55. Grassmann W., Hoermann H., von Portätius H., Z. Physiol. Chem., **321**, 120 (1960).
56. Wagner H., Hoerhammer L., Macek K., J. Chromatogr., **31**, 455 (1967).
57. Soczewiński E., Szumilo H., J. Chromatogr., **81**, 99 (1973).
58. Soczewiński E., Szumilo H., J. Chromatogr., **94**, 229 (1974).
59. Bark L. S., Graham R. J. T. Int. Symp. Chromatogr. Electrophor., 4th, 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 105.

60. *Graham R. J. T.*, J. Chromatogr., **33**, 118 (1968).
61. *Graham R. J. T., Nya A. E., Tinsley D. A.*, Int. Symp., Chromatogr., Electrophor., Lect., Pap., 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 105.
62. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, J. Chromatogr., **27**, 116 (1967).
63. *Trojna M., Hubaček J.*, Chem. Prum., **22**, 29 (1972).
- 63a. *Diamond P. F.*, J. Chromatogr., **32**, 419 (1968).
64. *Sherma J., Hood L. V. S.*, J. Chromatogr., **17**, 307 (1965).
65. *Lepri L., Desideri P. G., Landini M., Tanturli G.*, J. Chromatogr., **109**, 365 (1975).
66. *Lepri L., Desideri P. G., Landini M., Fanturli G.*, J. Chromatogr., **108**, 169 (1975).
67. *Lepri L., Desideri P. G., Landini M., Fanturli G.*, J. Chromatogr., **129**, 239 (1976).
68. *Barton G. M.*, J. Chromatogr., **26**, 320 (1967).
69. *Dittmann J.*, J. Chromatogr., **32**, 764 (1968).
70. *Jangaard N. O.*, J. Chromatogr., **50**, 146 (1970).
71. *Dass H. C., Weaver G. M.*, J. Chromatogr., **67**, 105 (1972).
72. *Haluk J. P., Duval C., Metche M.*, Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., Lect. Pap., 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 431.
73. *Joschek H. I., Muller S. I.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3276 (1966).
74. *Graham R. J. T., Daly J.*, J. Chromatogr., **48**, 78 (1970).
75. *Ibid.*, p. 67.
76. *Bark L. S., Daly J., Graham R. J. T.*, Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., 4th, 1966, Ann Arbor Sci., Ann Arbor, Mich., 1968, p. 128.
77. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, J. Chromatogr., **23**, 417 (1966).
78. *Ibid.*, **25**, 357 (1966).
79. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, Talanta, **13**, 1281 (1966).
80. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, J. Chromatogr., **25**, 347 (1966).
81. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, J. Chromatogr., **23**, 120 (1966).
82. *Bark L. S., Graham R. J. T.*, Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., 4th, 1966, Ann Arbor Sci., Ann Arbor, Mich., 1968, p. 119.
83. *Srivastava S. P., Dua V. K.*, Z. Anal. Chem., **275**, 29 (1975).
84. *Pastuska G., Trinks H.*, Chem.-Ztg., **86**, 135 (1962).
85. *Ibid.*, **85**, 535 (1961).
86. *Walker J. R. L., Thompson J. E.*, Lab. Pract., **18**, 629 (1969).
87. *Dhont J. H., de Rooy C.*, Analyst (London), **86**, 527 (1961).
88. *Knappe E., Rohdewald I.*, Z. Anal. Chem., **200**, 9 (1964).
89. *Thielemann H.*, Z. Chem., **9**, 190 (1969).
90. *Thielemann H.*, Sci. Pharm., **39**, 106 (1971).
91. *Thielemann H.*, J. Prakt. Chem., **312**, 728 (1970).
92. *Thielemann H.*, Pharmazie, **25**, 365 (1970).
93. *Thielemann H.*, Z. Anal. Chem., **253**, 38 (1971).
94. *Thielemann H.*, Pharmazie, **25**, 128A (1970).
95. *Smith G. A. L., Sullivan P. J.*, Analyst (London), **89**, 312 (1964).
96. *Crump G. B.*, Anal. Chem., **36**, 2447 (1964).
97. *Churáček J., Pechová H., Mareš V.*, J. Chromatogr., **67**, 97 (1972).
98. *Kondo T., Kawashiro I.*, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, **6**, 433 (1965).
99. *Renault J., Cartron M. F.*, Ann. Pharm. Fr., **25**, 291 (1967).
100. *Wildenhain W., Henseke G.*, J. Chromatogr., **19**, 438 (1965).
101. *Wildenhain W., Henseke G., Bienert G.*, J. Chromatogr., **45**, 158 (1969).

## ПРИРОДНЫЕ ПИГМЕНТЫ

## 1. КАРОТИНОИДЫ

Тонкослойная хроматография давно применяется для разделения каротиноидов. Еще в 1952 г. Моттье и Поттерат [1—3] показали возможность анализа методом круговой хроматографии на незакрепленных слоях оксида алюминия пищевых красителей, в том числе красящего экстракта *Bixa orellana*, содержащего биксин. Лагони и Вортман [4] также применили круговое элюирование на незакрепленном слое оксида алюминия для выделения β-каротина из масла и маргарина. Таким способом можно обнаружить 0,05 мкг этого соединения. Те же авторы [5] модифицировали эту методику с тем, чтобы можно было проводить количественные определения, начиная с минимальных обнаруживаемых количеств. Демоль [6] разделил каротин, биксин, кантаксантин и ксеаксантин на слоях закрепленной крахмалом кремневой кислоты, элюируя пробы смесью *n*-гексан—эфир (3:7, по объему). Фелкер [7] установил, что кантаксантин тождествен красному пигменту, содержащемуся в перьях *Cardinalis cardinalis*, *Calochaetes coccineus*, *Pharomachus mocino*, *Pyrocephalus rubinus*, *Guara rubra* и *Spinus cucullatus*. Томмен и Ваккернагель [8], применив колоночную и тонкослойную хроматографию, нашли этот пигмент в перьях и коже малого фламинго *Phoeniconaias minor*. Этот же пигмент найден в довольно высокой концентрации в печени этих птиц. У фламинго обнаружены также небольшие количества этерифицированного астаксантина и следы β-каротиноида. Тилеман [9] выделил кантаксантин и астаксантин из *Phoeniconaias minor* методом ТСХ на силикагеле со смесью дихлорметан—эфир (9:1).

Винтерштейн и Хегедюш [10, 11] изучали, насколько распространены в природных продуктах, и нашли, что обнаружить это вещество можно, обрабатывая хроматограммы роданином. При этом предел чувствительности обнаружения ретинена методом ТСХ понижается до 0,3 мкг. Благодаря способности роданина к конденсации с образованием сильноокрашенных продуктов он пригоден для обнаружения слабоокрашенных каротиноидных альдегидов. В последнем случае хроматограмму опрыскивают сначала спиртовым раствором роданина, а затем концентрированным водным раствором аммиака или гидроксида



натрия. Обработав этим реагентом тонкослойные хроматограммы, указанные авторы смогли обнаружить 8'-апо-β-каротиналь в слизистой оболочке кишечника.

Томмен [12], применив ту же методику, выделил 8'-апо-β-каротиналь, а также 2'-апо-β-каротиналь, 10'-апо-β-каротиналь и 3-окси-8'-апо-β-каротиналь из кожуры и сока апельсинов пяти сортов. Методом ТСХ Томмен [13] обнаружил 8'-апо-β-каротиналь вместе со значительными количествами 8'-апо-β-каротиновой кислоты в печени крыс, в корме которых содержалось первое соединение. Если в корм курам добавляли по 1 мг меченого 8'-апо-β-каротиналя, то в желтках яиц находили от 100 до 150 мкг меченой 8'-апо-β-каротиновой кислоты.

Вильдфейер [14] нашел 8'-апо-β-каротиновую кислоту с 30 углеродными атомами в молекуле и 10'-апо-β-каротиновую кислоту с 27 углеродными атомами в молекуле в желтках яиц кур, которым давали в корме 8'-апо-β-каротиналь в количестве 10 мг/кг.

Винтерштейн и др. [15] анализировали методом ТСХ различные природные продукты на содержание каротинов. Хроматографические слои они получали смешением 5 г силикагеля G и 20 г гидроксида кальция. Как элюирующий растворитель для адсорбционного разделения в большинстве случаев применяли смесь петролейный эфир (80—105°C)—бензол (1:1). При необходимости состав этой смеси варьировали, меняя соотношение компонентов, а также добавляя к смеси 1% метанола. Таким способом удалось разделить альдегиды на две группы: C<sub>37</sub>, C<sub>32</sub>, C<sub>27</sub> и C<sub>40</sub>, C<sub>35</sub>, C<sub>25</sub>. Эти же авторы использовали также распределительную хроматографию на тонкослойных пластинках. В этом случае погружали высушенные пластинки с силикагелем на две минуты в 5%-ный раствор парафинового масла в петролейном эфире. Затем петролейный эфир удаляли, с этой целью пластинки сушили в горизонтальном положении 10 мин при 120°C. Элюирующим растворителем служил метанол, насыщенный парафиновым маслом. Используя как адсорбент смесь силикагеля и гидроксида кальция, а как растворитель смесь бензол—этил-ацетат (77:23), Бокс и Бёкеноген [16] разделили каротиноиды и феофитин, находящиеся в соевом, рапсовом и льняном маслах.

Бьёрнланд и Агилар-Мартинез [17] разделяли каротиноиды, содержащиеся в красных морских водорослях, на слои из силикагеля и карбоната кальция (1:1), а также из силикагеля, гидроксида кальция, оксида магния и сульфата кальция (10:4:3:1), элюируя пробы смесями петролейный эфир—ацетон—изопропанол, взятых в различном соотношении. Таким способом удалось отделить ацетиленовые каротиноиды от неацетиленовых. Шерма [18] разделял различные хлорофилловые и каротиноидные пигменты морских водорослей на слоях цел-

люлозы, используя как растворитель смесь петролейный эфир (20—40°C)—бензол—хлороформ—ацетон—изопропанол (10:7:2:1:0,034). Рай и Ли [19] пользовались слоями, приготовленными из смеси целлюлоза MN 300—сахар (фирма C and H)—картофельный крахмал (8:2:0,03), для разделения пигментов планктонных водорослей 0,05%-ным раствором *n*-пропанола в петролейном эфире.

Эггер [20] применил хроматографию с обращенными фазами и провел разделение на слое кизельгура, пропитанного растительным маслом. Предложенный им метод пропитки включает следующие операции. Просушенную пластинку погружают в 7%-ный раствор растительного масла (можно заменить растительное масло на парафин) в петролейном эфире (100—140°C) на такую глубину, чтобы растворитель не доходил до края пластинки на 3—4 см. Затем растворитель удаляют, выдерживая пластинки 24 ч при комнатной температуре или нагревая в течение часа при 70°C. Пробу наносят на непропитанную часть пластинки, поскольку при этом образуется узкая полоска, а не круглое пятно, в результате чего достигается более четкое разделение. На обычным образом пропитанной пластинке образуются круглые пятна, и пробу на нее необходимо наносить в виде более концентрированного раствора. Элюирование ведут смесью метанол—ацетон—вода (20:4:3), насыщенный пропитывающим маслом. Родоксантин, у которого такая же величина  $R_f$ , что и у хлорофилла *b*, можно отделить от последнего элюированием смесью ацетон—вода (3:1); при таком способе элюирования  $R_f$  этих соединений равны соответственно 0,26 и 0,30. Растительное масло, пропитавшее слой кизельгура, удаляют промывкой петролейным эфиром, после чего можно элюировать родоксантин с пластинки *N,N*-диметилформамидом и снять его ИК-спектр. Ниче [21] применял хроматографирование с обращенными фазами на целлюлозе, пропитанной триглицеридом. При элюировании смесью метанол—ацетон—вода (40:10:3) были разделены неоксантин, дезэпоксинеоксантин (алленовый каротиноид), виолаксантин, антраксантин, зеаксантин и криптоксантин. *цис-транс*-Изомеры ксантофиллов разделяли на основном карбонате магния, элюируя смесью петролейный эфир—ацетон (5:1).

Ислер и др. [22] разделяли различные каротины на гидроксиде кальция, смешанном с силикагелем (6:1); элюирующим растворителем служила смесь петролейный эфир—бензол (2:3). Ту же хроматографическую систему они применили и для разделения β-апокаротиновых кислот от C<sub>27</sub> до C<sub>40</sub>.

Гроб и др. [23, 24], а также Эйхенбергер и Гроб [25—27] выделяли различные каротиноиды, содержащиеся в растениях,

на слоях силикагеля G и оксида алюминия. В качестве растворителей они использовали смеси петролейного эфира, бензола и спирта, меняя соотношение компонентов от 50:50:1 до 100:20:7 при разделении на пластинках с силикагелем и до 100:100:1, если разделение велось на пластинках с оксидом алюминия. Гроб и Боскетти [28] использовали циклогексан и силикагель G для отделения ликоперсена (предшественника каротина) от сквалена. В этом случае пятна обнаруживали 10 %-ным раствором трихлорида сурьмы в хлороформе. Для отделения ликоперсена от сквалена на том же адсорбенте Дэвис, Гудвин и Мерсер [29] элюировали пробу лигроином. Гроб [30] использовал эти методы ТСХ для подтверждения выдвинутой им теории биогенеза каротина и каротиноидов.

Анализируя смесь каротиноидных пигментов, применяемых в качестве пищевых красителей пастилы, Рисполи и Ди Джакомо [31] элюировали пробы смесями петролейный эфир (50—70°C)—бензол—ацетон (160:40:4) и петролейный эфир (50—70°C)—этилацетат—хлороформ (160:40:4). Разделение проводили на силикагеле G. Подобным же образом Бенк и др. [32] методом ТСХ на силикагеле выделили ряд каротиноидов, добавляемых в качестве окрашивающих добавок к апельсиновому соку. Большинство применяемых с этой целью в настоящее время каротиноидов можно разделить, элюируя смесью петролейный эфир—бензол—ацетон—уксусная кислота (80:20:2:1). Ликопен и  $\beta$ -каротин разделяли при элюировании петролейным эфиром. Некоторые из медленно перемещающихся каротиноидов разделяли смесью тех же растворителей, но при несколько другом их соотношении.

Монтаг [33] анализировал методом двумерной хроматографии на силикагеле жирорастворимые пигменты, применяемые как пищевые красители. В эту группу входили природные пигменты биксин, норбиксин, каротин, капаксантины, куркумин и кроцин. Элюирующими растворителями служили бензол и смеси хлороформ—уксусный ангидрид (75:2), метилэтилкетон—уксусная кислота—метанол (40:5:5), обнаруживающим реактивом — 20 %-ный раствор трихлорида сурьмы в хлороформе.

Корби [34] использовал сульфат бария при хроматографировании природных пищевых красителей.

Дюкенуа и Мейлендер [35] изучали продукты окисления  $\beta$ -каротина, а Дэвис и др. [36, 37] исследовали образование ликоперсена в *Neurospora crassa*. Эггер [38] опубликовал работу по тонкослойной распределительной хроматографии пигментов пластид, где показал, что на величину  $R_f$  влияет соотношение компонентов в элюирующих смесях ацетона и 95 %-ного метанола. Холноки и др. [39], исследуя структуру криптокапсина,

нашли, что при элюировании на силикагеле легким петролейным эфиром (60—80°C) с добавкой 2 % ацетона  $R_f$  этого соединения равна 0,47.

Боллиджер и др. [40] разделяли каротины на оксиде магния (см. табл. 28.1). Эггер и Фойгт [41] разделили 31 каротиноид на полиамиде, содержащем 15 % целлюлозы, с 7 системами растворителей. Хагер и Странский [42—45] использовали смесь карбонат кальция—оксид магния—гидроксид кальция (15:3:2) в качестве адсорбента для разделения большого числа каротиноидов под действием смеси легкий петролейный эфир—ацетон—хлороформ—метанол (50:50:4:1). Филип и Фрэнсис [47] указали состав (процентное соотношение) смесей этанола, бензола, ацетона и петролейного эфира, применяемых для разделения различных классов каротиноидов на силикагеле: полиолы и дикетодиолы 3,5:10:20:66,5; диэпоксид-, монокетон- и моноэпоксидиолы 3,0:10:20:67,0; диолы 2,0:10:20:68,0; моноспирты 0:10:20:70 и углеводороды 0:0:5:95. Эти же авторы привели таблицу величин  $R_f$ , полученных на силикагеле для капсантина и родственных соединений. Сингх и др. [48] разделяли апокаротиноиды и родственные им соединения на силикагеле с 4 различными системами растворителей. Ноулесс и Ливингстон [49] применили двумерное хроматографирование на двухслойных пластинках для анализа каротиноидов, входящих в состав пищевых продуктов. Первый адсорбционный слой состоял из смеси оксида магния и целита (фирма Johns Manville), взятых в соотношении 1:4, а непосредственно примыкающий к нему второй слой представлял собой смесь силикагеля G и гидроксида кальция, взятых в соотношении 1:6. Первое элюирование проводили вдоль полоски первого слоя смесью гексан—ацетон (7:3), второе — по слою из смеси силикагеля с гидроксидом кальция 2 %-ным раствором бутанола в бензоле. Из-за частичной изомеризации неоксантина и виолаксантина в их 5,8-эпоксиизомеры на пластинку наносили полоску смеси силикагеля и гидроксида кальция шириной 3 см, а остальную часть пластинки покрывали смесью оксида магния и кизельгура в соотношении 1:4. В этом случае первое элюирование проводили вдоль полоски из силикагеля с оксидом кальция, применяя 2 %-ный раствор бутанола в бензоле, содержащий добавку этоксилина в качестве антиоксиданта. Во втором направлении пробу элюировали смесью гексан—ацетон (7:3), также содержащей этоксилин.

Роллинс [50] разработал методику разделения пигментов листьев на тонком слое силикагеля элюированием смесью бензол—ацетон (7:3), специально предназначенную для демонстрации студентам.

Таблица 28 1

Величины  $R_f \times 100$  каротиноидов, полученные в различных хроматографических системах <sup>а</sup>

Каротиноид	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Аллоксантин					20 [42]			
Афанизофилл					5 [43]			
8'-Апо-β-кароти- наль		34						
Биксин	51	8						
Калоксантин					24 [43]			
Кантаксантин	38	9			83 [44]		80	
Капаксантин		0						
α-Каротин				75 [46]		66		0
β-Каротин	96	97		64 [46]		49	80	0
γ-Каротин						11		
δ-Каротин						22		
ε-Каротин						70		
Кроцетин		16						
Крококсантин					75 [42]			
Криптокапсин			47					
Криптоксантин					77 [44]		74	7
Диадноксантин					41 [45]			
Диатоксантин					28 [45]			
Эквиненон					88 [44]		72	
Этил-8'-апо-β-ка- ротиноат		54						
3,3'-Оксиэквиненон					80 [43]			
Гетероксантин					12 [45]			
Изоэаксантин	63							
Ликопен		96					60	
Ликоперсен				30 [29]				
Лютеин							95	56
Лютеинэпоксид								72
Метил-8'-апо-β- каротиноат		47						
Миксоксантофилл					3 [43]			
Неоксантин					49 [44]		96	95

Продолжение табл. 28 1

Каротиноид	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
Осциллаксантин					6 [43]			
Фитоеин				21 [29]				
Фитофлюен				12 [29]				
Родоксантин							40	26
Ваухериаксантин					19 [45]			
Виолаксантин						93	84	
Зеаксантин	17					82		

<sup>а</sup> Хроматографические системы: А — силикагель, *n*-гексан—эфир (3:7), длина пути элюирования 7,6 см [6]; Б — силикагель, петролейный эфир—бензол—ацетон—уксусная кислота (80:20:2:1), 10 см [32]; В — силикагель, петролейный эфир (60—80 °С)—ацетон (98:2) [39]; Г — силикагель, легкий петролейный эфир; Д — карбонат кальция—оксид магния—гидроксид кальция (15:3:2), легкий петролейный эфир—ацетон—хлороформ—метанол (50:50:4:1); Е — оксид магния, легкий петролейный эфир—бензол (1:1) [40]; Ж — полиамид—целлюлоза (17:3), метанол—метилэтилкетон (1:1) [41]; З — кизельгур, пропитанный растительным маслом; метанол—ацетон—вода (20:40:3), насыщенные растительным маслом, 20 см [20].

Физер [51] сформулировал методику демонстрации выделения методом ТСХ ликопена из томатной пасты и β-каротина из отжатой моркови.

Из-за неустойчивой природы этих пигментов рекомендуется проводить их хроматографирование в темноте. Хагер и Бертенрат [52] не советуют пользоваться кислым адсорбентом и рекомендуют добавлять аскорбиновую кислоту в качестве антиоксиданта. Тонкие слои адсорбента они готовят из смеси, состоящей из 12 г кизельгура G, 3 г силикагеля, 3 г карбоната кальция (analytical-grade), 0,018 г гидроксида кальция (analytical-grade) и 55 мл водного раствора аскорбиновой кислоты такой концентрации, чтобы в этом объеме содержалось  $5 \cdot 10^{-3}$  моль растворенного вещества. Ввиду того что через час аскорбиновая кислота начинает распадаться, лучше всего пользоваться свежеприготовленными пластинками. Хагер и Бертенрат использовали как растворитель смесь петролейный эфир (100—140 °С)—изопропанол—вода (100:10:0,25). Величины  $R_f$  различных каротинов приведены в табл. 28.1. Раман и Эггер [53] хроматографировали лоницераксантин и веббиаксантин смесью метанол—ацетон—вода (10:2:1) на целлюлозе, так как эти соединения неустойчивы при хроматографировании на силикагеле, оксиде магния или карбонате цинка.

Фоппен [54] опубликовал серию из 232 таблиц, помогающих идентифицировать каротиноиды. Эти таблицы содержат хроматографические и некоторые физические (спектры поглощения в разных спектральных областях и температуры плавления) характеристики каротиноидов.

### Количественное определение

Винтерштейн и Хегедош [11] определяли содержание каротиноидов в пробах полуколичественным методом, сравнивая размеры пятен разделенных соединений и пятен стандартного вещества. Ошибка определения в этом случае составляет  $\pm 30\%$ . С целью более точного определения можно элюировать пигмент с хроматограммы и измерить поглощение на спектрофотометре [15, 23, 25, 55]. Как элюирующий растворитель особенно эффективен диметилформамид, поскольку в этом растворителе пигменты устойчивы, а их спектры похожи на спектры в эфирном растворе [20]. Диметилформамид можно рекомендовать и при проведении распределительной хроматографии, так как из раствора пигментов в ДМФ можно удалить примесь пропитывающего масла, промывая его петролейным эфиром.

Гарсайд и Рили [56] использовали отражательную денситометрию для определения содержания пигментов фитопланктона после разделения на силикагеле G смесью легкой петролейный эфир—этилацетат—диметилформамид (55:32:13). Хлорофилл С, который оставался в начальном положении, элюировали смесью легкой петролейный эфир—этилацетат—диметилформамид (1:1:2). Точность определения большинства пигментов составляла  $\pm 5\%$  или не превышала 0,5 мкг.

### Препаративное разделение

Чтобы получать вещества в количествах, достаточных для их идентификации, Винтерштейн и др. [15] использовали от 10 до 20 пластинок размером 20×20 см с 30 пятнами на каждой. В одном пятне содержалось от 0,1 до 0,3 мкг каротиноида. По окончании разделения окрашенные зоны соскребали с пластинок и экстрагировали эфиром в маленьких центрифужных пробирках; адсорбент отделяли центрифугированием.

## 2. ХЛОРОФИЛЛЫ

При разделении каротиноидов, добавляемых в апельсиновый сок, Бенк и др. [32] отделяли хлорофиллы от каротиноидов на силикагеле, элюируя пробу смесью петролейный эфир—бензол—

ацетон—уксусная кислота (80:20:2:1); но в этой хроматографической системе нельзя разделить два различных хлорофилла. Такое разделение было выполнено Кольменом и Вишняком [57] на тонких слоях сахарозы. Получали они такие слои из густой суспензии кондитерского сахара, содержащего 3% крахмала, и метанола, взятых в равных количествах (масса/объем). Приготовленную суспензию наносили на пластинки и сушили 2 ч при 40°C. Чрезмерного высушивания следует избегать, потому что сахароза сплавляется в твердую застеклованную массу, не обладающую адсорбционными свойствами. Смесью петролейный эфир (66—75°C)—ацетон (95:5) разделяли хлорофиллы,  $\beta$ -каротин, лютеин и неоксантин. Поскольку разделение виолакантина и хлорофилла А может быть неполным, целесообразно провести второе элюирование смесью петролейный эфир (37—49°C)—метанол (98:2) или использовать эти два растворителя в двумерном разделении. Наттинг и др. [58] разделяли хлорофиллы на слоях сахарной пудры.

Хагер и Бертенрат [52] разделили хлорофиллы А и В из экстракта зерен на смешанном адсорбенте, состав которого, как и состав элюирующего растворителя, указан в разд. 1, посвященном каротиноидам. Эггер [20] применил хроматографирование с обращенными фазами для разделения хлорофиллов и продуктов их разложения. На пластинках с кизельгуром, пропитанном 7%-ным раствором триглицерида (растительного масла) в петролейном эфире, при элюировании смесью метанол—ацетон—вода (20:4:3), насыщенной пропитывающим маслом, получены следующие величины  $R_f$ : хлорофилл А 0,13, хлорофилл В 0,25, феофитин А 0,1, феофитин В 0,07, алломеры А' 0,08 и алломеры В' 0,19. В данном растворителе родоксантин имеет ту же величину  $R_f$ , что и хлорофилл В; эту пару веществ можно разделить, применяя как растворитель смесь ацетон—вода (3:1), в которой родоксантин характеризуется  $R_f$ , равным 0,31, а хлорофилл В— $R_f$ , равным 0,26.

Джонс и др. [59] проверяли методику Эггера. Они получили наилучшие результаты при разделении на кизельгуре G, пропитанном 14% арахисового масла; однако на непропитанной части пластинки, где наносили пробу, наблюдалось окисление. Эггер показал, что при нанесении пробы на непропитанную часть слоя образуются более четкие пятна, чем при нанесении на пропитанную часть. Джонс и др. [59] нашли, что можно избежать ухудшения результатов, вызванного нанесением пробы на пропитанный слой, если добавить к раствору пробы антиоксидант (на 1 мл раствора пробы 0,1 мл раствора 150 мг 3,5-ди-трет-бутил-4-окситолуола в 100 мл диэтилового эфира). Дейли и др. [60] указали, что можно предотвратить окисление, если вводить пробу в атмосфере азота, но при этом нет

необходимости проводить последующее элюирование в атмосфере азота. Поскольку хроматография на одной пластинке не обеспечивает разделения всех компонентов экстракта, эти авторы применяли следующий ряд хроматографических систем: для соединений «нижнего ряда» (феофитин) — слой, пропитанный 8 % парафинового масла, элюирующий растворитель — смесь метанол—ацетон—изопропанол—вода—бензол (35:50:10:10:2); для соединений «среднего ряда» (хлорофиллы) — слой, пропитанный 4 % триолеина, элюирующий растворитель — смесь тех же компонентов, но в соотношении 60:20:10:10:2; для соединений «высшего ряда» (феофорбиды) — слой, пропитанный 10 % касторового масла, элюирующий растворитель — та же смесь, но с соотношением компонентов 80:2,5:2,5:15:2. В некоторых случаях соотношение компонентов смеси менялось. Для пропитки адсорбента парафином и триолеином использовали в качестве растворителя петролейный эфир (30—60°C), а для пропитки касторовым маслом метанол. Всего было разделено 18 идентифицированных и 8 неизвестных производных хлорофиллов А, В и С.

Шимизу и др. [61], исследуя метаболизм хлорофилла в высших растениях, использовали ТСХ для количественного определения фитола.

Энвар [62] анализировал пигменты хлорофилла на тонкослойной полоске размером 25×200 мм со слоем кремневой кислоты с добавкой крахмала в качестве связующего. Разделение велось при непрерывном элюировании. С этой целью у края полоски за пробкой, закрывающей отвод из хроматографической камеры, помещали бумажный фитиль. Элюирующими растворителями служили смеси изоктан—ацетон—эфир (3:1:1) и изоктан—ацетон—тетрахлорид углерода (3:1:1).

Бэкон [63] хроматографировал хлорофиллы А и В и их производные на слоях целлюлозы, элюируя их смесью петролейный эфир (60—80°C)—ацетон—*n*-пропанол (90:10:45) на расстоянии 15 см. Шнейдер [64] разделил 9 пигментов пластид на целлюлозе MN 300 смесью метанол—дихлорметан—вода (50:9:10).

Левеншус и Вакелин [65] на слоях сахарозы с крахмалом (97:3) выделили хлорофиллы А и В из растительных экстрактов, используя как элюирующий растворитель смесь петролейный эфир (30—60°C)—хлороформ (3:1). Разделенные зоны собирали с пластинки и нагревали 4 ч с разбавленной соляной кислотой при 90°C, чтобы гидролизовать сахарозу. После добавления известного количества магния определяли содержание магния в пятнах посредством атомно-абсорбционной спектроскопии. Чувствительность обнаружения таким способом составляет примерно 1 нг.

### 3. АНТОЦИАНЫ

Эти соединения представляют собой водорастворимые пигменты, которые содержатся в клеточном соке прежде всего плодов и цветов, а в некотором количестве также и в других частях растений. Благодаря этим пигментам в растительном царстве появляются оттенки синего, пурпурного, фиолетового, розовато-лилового, фуксинового цветов и большая часть красных оттенков. По своей природе они относятся к гликозидам и при гидролизе разбавленными минеральными кислотами образуют антоцианидины и остатки сахаров. Анализировать можно и сами антоцианы и антоцианидины.

Нибом [66, 67] разделял агликоны на слоях целлюлозы и нашел, что для этой цели весьма удобна целлюлоза MN 300 производства Machegey, Nagel. Пигменты Нибом экстрагировал из растений метанолом; в тех случаях, когда содержание пектинов было очень высоким, метанол он заменял на 50 %-ный изопропанол. Предварительная очистка экстракта проводилась следующим образом: к экстракту добавляли гидроксид аммония до рН 9 и затем осаждали пигменты насыщенным раствором ацетата свинца в метаноле. Возможен и другой способ очистки: пигменты адсорбируют смолой дауэкс 50W-X4. После промывки осадка или ионообменного вещества пигменты извлекают 2 %-ным раствором соляной кислоты в метаноле. Агликоны получают, гидролизуя две части очищенного экстракта одной частью концентрированной соляной кислоты; гидролиз ведется 30 мин при 100°C. Далее антоцианидины растворяют в амилловом спирте и полученный раствор наносят на хроматографические пластинки. Собственно разделение проводят на пластинке размером 12×16 см методом двумерного элюирования сначала смесью муравьиная кислота—соляная кислота—вода (10:1:3) вдоль короткой стороны пластинки, а затем смесью амилловый спирт—уксусная кислота—вода (2:1:1) вдоль длинной стороны. Этот метод применили для обнаружения антоцианидинов в 40 различных растительных пробах.

Р. Парис и М. Парис [68] использовали также слои целлюлозы для разделения антоцианидинов и антоцианов. Для разделения последних эти авторы применяли три растворителя: смеси бутанол—2 н. соляная кислота (1:1) с добавкой 10 или 20 % этилацетата и бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). Антоцианидины разделяли смесью уксусная кислота—соляная кислота—вода (10:1:3), а также уксусная кислота—вода (3:2). С последними двумя растворителями проводили разделение также на пластинках с полиамидом.

Гупта [69] испытал ряд растворителей, применяемых в хроматографии антоцианов на бумаге, но нашел, что среди

испытанных растворителей только верхняя фаза смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) и смесь вода—уксусная кислота—соляная кислота (82:15:3) пригодны для ТСХ на слоях целлюлозы. Первый из упомянутых растворителей, а также смесь уксусная кислота—соляная кислота—вода (30:3:10) эффективны также при разделении антоцианидинов на целлюлозе. Муллик [70] использовал микрокристаллическую целлюлозу Avicel SF для двумерного хроматографирования антоцианидинов. При этом четыре растворителя, не содержащие спиртов, применялись в сочетании с четырьмя растворителями, содержащими спирты. Этими растворителями были следующие смеси: уксусная кислота—соляная кислота—вода (30:3:10), уксусная кислота—муравьиная кислота—соляная кислота—вода (2:5:1:6), муравьиная кислота—4 н. соляная кислота (2:1), муравьиная кислота—соляная кислота—вода (10:1:3), метанол—соляная кислота—вода (190:1:10), *n*-амиловый спирт—уксусная кислота—вода (2:1:1), *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5, верхняя фаза) и *трет*-бутанол—2 н. соляная кислота—уксусная кислота—вода (6:1:1:2, свежеприготовленная смесь). Единственной эффективной системой из двух содержащих спирт растворителей оказалось сочетание метанола (для элюирования в одном направлении) и амилового спирта (для элюирования в другом направлении). Метанольный растворитель оказался достаточно эффективным: он разделяет антоцианидины главным образом в соответствии с числом ОН-групп в кольце В независимо от степени метилирования соединений. Целлюлоза Avicel SF—лучший адсорбент, чем целлюлоза MN 300.

Барритт и Торре [71] также использовали слои микрокристаллической целлюлозы для разделения антоцианов; лучшим сочетанием двух элюирующих растворителей оказалось сочетание смеси *n*-бутанол—соляная кислота—вода (5:2:1) и вода—соляная кислота—муравьиная кислота (8:4:1). При выделении антоцианов из различных фруктов экстракт, извлеченный смесью метанол—вода (1:1), фильтровали через слой нерастворимого в воде поливинилпирролидона (PVP), который затем промывали последовательно водой и метанолом. Антоцианы элюировали из PVP 0,1 %-ной соляной кислотой. После сушки под вакуумом пигменты растворяли в 0,01 %-ном растворе соляной кислоты в метаноле. Вролстад [72] предпочитает чисто целлюлозным слоям смешанный слой, состоящий из нерастворимого PVP (Polysar AT, производства General Aniline and Film) и измельченной до частиц размером 100—150 меш целлюлозы, взятых в соотношении 1:9. На смешанном адсорбенте получают меньшие пятна, что обеспечивает лучшее разрешение и лучшее количественное определение. Перед использованием PVP

очищали по методу Лумиса и Батайля [73] от следов пероксида водорода. При разделении антоцианов пробу элюировали в одном направлении смесью уксусная кислота—вода—соляная кислота (15:82:3), а в другом направлении верхней фазой смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). Маллик [74] нашел, что после двумерного разделения на целлюлозе Avicel SF обработка хроматограммы парами аммиака повышает чувствительность определения антоцианидинов до <0,01 мкг; опрыскивание свежим 4 %-ным раствором молибдата аммония и последующая сушка горячим воздухом вызывают устойчивое и воспроизводимое окрашивание пятен при чувствительности порядка 0,1 мкг. Для того чтобы отличить пеларгонидин от пеонидина, пластинку опрыскивают 1 %-ным раствором ацетата свинца в 75 %-ном этаноле и затем сушат горячим воздухом. Гупта [69] анализировал антоцианы на слоях силикагеля и целлюлозы со смесью этилацетат—муравьиная кислота—метилэтилкетон—вода (5:3:3:1). Нибом [75] проводил на целлюлозе двумерное разделение антоцианов, полученных из американской черной малины. Он использовал две системы элюирующих растворителей: смеси *n*-бутанол—соляная кислота—вода (5:2:1) в одном направлении и вода—соляная кислота—муравьиная кислота (8:4:1) в другом направлении, а также смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (6:1:2) в одном направлении и вода—соляная кислота—пропионовая кислота (10:2:3) в другом направлении.

Биркофер и др. [76] использовали слой из смеси полиамида и полиакрилонитрила (2:7), которую смешивали не с водой, а с 0,05 М раствором бифосфата калия. Антоцианидины и антоцианы элюировали смесью пентанол—1-пропанол—уксусная кислота—вода (3:2:2:1). Тенденцию к образованию прожилки можно подавить, добавляя 1—2 части 1-гептанола или 1-гексанола.

В работе [77] описано разделение антоцианов на слое силикагеля. Элюирующим растворителем служили смеси бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2) и этилформиат—метилэтилкетон—муравьиная кислота—вода (3:4:1:2). Гесс и Мейер [78] разделяли антоцианы на силикагеле G, элюируя пробу смесью этилацетат—муравьиная кислота—вода (14:3:3) на 10 см, только в некоторых случаях, когда величины  $R_f$  анализируемых соединений слабо различались, длина пути элюирования составляла 13 см. Если в разделяемой смеси находились три соединения—3-моноголюкозиды пеларгонидина, пеонидина и мальвидина, при элюировании смесью *n*-бутанол—муравьиная кислота—вода (17:1:2) достигалось лучшее разделение, чем при элюировании смесью этилацетат—муравьиная кислота—вода. При двумерном хроматографировании для элюирования использовали

Таблица 28.2  
 Величины  $R_f \times 100$  антоцианов и антоцианидинов, полученные в различных хроматографических системах<sup>a</sup>

Соединение	Полиакрило- нитрил—поли- амид (Г:2), сплешаный, с 40 мг 0,05 М раствора монофосфата калия [16]	Силикагель D-O (САМАО) [17]		Целлюлоза MN300 [55]		Целлюлоза [68]		Полиамид [68]	
		Б	В	Г	Д	Е	Ж	Е	Ж
Антоцианидины									
Цианидин-3-моногликозид	46								
Цианидин-3-тригликозид	42								
Цианидин-3,5-дигликозид	36	36	52						
Дельфинидин-3-моногликозид	57	35	26						
Дельфинидин-3,5-дигликозид	54	60	61						
Мальвидин-3-моногликозид	38	44	33						
Мальвидин-3,5-дигликозид		56	37						
Пеонидин-3-моногликозид									
Петунидин-3-моногликозид									
Антоцианы									
Цианидин	31	83	92	47	53	70	75	57	75
Дельфинидин	21			41	34	50	60	50	72
Мальвидин	37	95	94	62	61	87	84	84	91
Пеонидин	39			55	65	90	86	83	85
Пеларгонидин	41			51	71	95	92	69	78
Петунидин	27			54	46	70	75	72	79

<sup>a</sup> Растворители: А — 1-пентанол—1-пропанол—уксусная кислота—вода (3:2:2:1); чтобы снизить вероятность появления прожлока, можно добавить 2 части 1-гептанола, длина пути элюирования 12 см; Б — 1-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:2); В — этилформат—метилэтилкетон—муравьиная кислота—вода (3:4:1:2); Г — муравьиная кислота—соляная кислота—вода (10:1:3); Д — амилловый спирт—уксусная кислота—вода (2:1:1); Е — уксусная кислота—соляная кислота—вода (10:1:3), 12 см; Ж — уксусная кислота—вода (3:2), 12 см.

смесь, содержащую этилацетат, и смесь, содержащую бутанол. Антоцианидины разделяли смесью этилацетат—уксусная кислота—вода (85:6:9). Антоцианы и антоцианидины обнаруживаются при непосредственном наблюдении в УФ-свете, интенсивность окраски пятен можно увеличить, опрыскивая хроматограммы 10 %-ным раствором щавелевой кислоты в смеси ацетон—вода (1:1). Величины  $R_f$  некоторых антоцианов и антоцианидинов даны в табл. 28.2.

Для разделения антоцианов в препаративных количествах Азен [79] использовал в виде слоев толщиной 1 мм смесь (2:1) силикагеля адсорбосил-2 и порошкообразной целлюлозы MN 300, (не содержащей гипса). На этих слоях получено лучшее разделение, чем на чистом силикагеле. Чтобы отделить цианидингликозиды от пеларгонидингликозидов, автор работы [79] элюировал пробу смесью 1-бутанола и 2 н. соляной кислоты (1:1), приготовленной за 24 ч до начала хроматографирования, а затем с помощью смеси вода—соляная кислота—муравьиная кислота (8:4:1) разделял индивидуальные гликозиды.

#### 4. ФЛАВОНОИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Соединения этой группы, получившие наименование от латинского слова «желтый», широко распространены как в свободном состоянии, так и в виде гликозидов.

Впервые ТСХ была применена для анализа соединений этого типа в 1957 г. Стэнли и Ванье [80, 81], которые таким методом разделили несколько кумаринов и фурукумаринов, содержащихся в лимонном масле (табл. 28.3). Эти соединения выделяли хроматографированием на колонке с кремневой кислотой, проверяя разделение по методу Миллера и Кирхнера [82]. При использовании флуоресцентных хроматографических полосок пятна указанных соединений обнаруживали облучением УФ-светом [83]. Стэнли и Ванье [84, 85] разработали методику количественного определения содержания кумаринов в цитрусовых маслах с помощью непрерывной нисходящей хроматографии (см. т. 1, гл. V, разд. 3). После разделения этих соединений пятна элюировали этанолом и измеряли оптическое поглощение элюата на спектрофотометре. Свифт [86] разработал метод спектрофотометрического определения флавонов в нейтральной фракции сока из апельсиновой кожуры. Для получения достаточного разделения, которое можно было контролировать по поглощению в УФ-области, применяли многократное элюирование на слоях силикагеля с 15 %-ным раствором *n*-бутанола в гексане.

Хёрхаммер и Вагнер [87] также исследовали флавоноиды цитрусовых. Они проводили разделение на тонких слоях

Таблица 28.3

Величины  $R_f \times 100$  некоторых кумаринов и фурукумаринов, найденных в лимонном масле <sup>a</sup>

Соединение	$R_f \times 100$
5-Гераноксипсорален	68
7-Метокси-5-гераноксикумарин	64
5-( $\gamma,\gamma$ -Диметил) аллилксипсорален	57
7-Метокси-5-( $\gamma,\gamma$ -диметил) аллилксиккумарин	50
8-Гераноксипсорален	40
5,7-Диметоксикумарин	25
Биакангелицин	0

<sup>a</sup> Адсорбент: кремневая кислота с крахмалом в качестве связующего; растворитель: гексан—этилацетат (3:1).

силикагеля (Woelm), элюируя пробу смесью бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). В работе [87] не даны величины  $R_f$ , но в ней описана методика выделения следующих соединений: гесперидин, гесперетин, эриодиктин, нарингин и нарингенин. Гесперидин и нарингин характеризуются близкими величинами  $R_f$ , но их легко различить, обрабатывая хроматограмму реактивом на основе красителя прочный синий В. При этом гесперидин дает синие, а нарингин фиолетовые пятна. Количественный метод определения этих соединений заключается в следующем: элюаты обрабатывают сначала 2,4-динитрофенилгидразином, а затем гидроксидом калия, чтобы получить окрашенные растворы, оптическое поглощение которых измеряют при 480 нм.

Фишер и др. [88] разработали колориметрический метод определения нарингина в грейпфрутах. Нарингин и нарингенин-7 $\beta$ -рутинозид разделяли на адсорбенте, представляющем собой смесь полиамида, силикагеля и рисового крахмала (5,5:0,4:0,8), элюируя пробы дважды смесью нитрометан—метанол (5:2). Пятна соединений обнаруживали по флуоресценции после опрыскивания 1 %-ным раствором хлорида алюминия в этаноле, а после элюирования с пластинки определяли содержание соединений в элюате по методу Дэвиса [89], основанному на применении щелочного раствора диэтиленгликоля. Хёрхаммер и др. [90] хроматографировали на силикагеле смесь 13 флавоноидов, используя как элюирующий растворитель смесь

бензол—пиридин—муравьиная кислота (36:9:5). Перед опрыскиванием обнаруживающими реактивами пластинки тщательно сушили, чтобы удалить муравьиную кислоту и пиридин. Авторы [90] применяли два реактива для обнаружения: 25 %-ный раствор основного ацетата свинца и 10 %-ный раствор трихлорида сурьмы в хлороформе. Флуоресценцию наблюдали при освещении УФ-лампой с максимумом излучения при 366 нм. Хёрхаммер и Вагнер [91] исследовали также изофлавононы, содержащиеся в растительных экстрактах.

Дагган [92, 93] разделял флавонолглюкозиды груш и других фруктов на микрокристаллической целлюлозе методом двумерного элюирования смесями уксусная кислота—вода (15:85) и фенол—вода (4:1) (масса/масса). Для хроматографирования агликонов применяли смесь уксусная кислота—соляная кислота—вода (30:3:10). Жакен-Дюбрей [94] разделял флавоноиды сурепицы *Reseda luteola* L. на слоях целлюлозы, предварительно элюированных этанолом для удаления примесей. Элюирующим растворителем служила смесь *n*-бутанол—метилэтилкетон—вода (5:3:3). Количественные результаты получены непосредственной денситометрической поглощения в ультрафиолетовой области. Спигл [95] использовал смесь целлюлозы MN300 и полиамида Woelm DC (30:1) для разделения на ней флавоноидов 15, 40 и 60 %-ной уксусной кислотой. Для отделения агликонов от глюкозидов он проводил двумерное элюирование 60 %-ной и 15 %-ной уксусной кислотой. Обнаружение пятен осуществлялось реактивами Т-102 и Т-118 или по флуоресценции после опрыскивания 2 %-ным раствором хлорида алюминия в 70 %-ном этаноле.

Из-за различия производных кумарина Хёрхаммер и др. [96] смогли установить факт подделки *Radix pimpinellae* корнями аканта (*Heracleum spondylium*). Чтобы обнаружить подделку, мелко измельченный корень экстрагировали петролейным эфиром, наносили пробу экстракта на слой силикагеля и элюировали хлороформом на 12 см. После УФ-облучения хроматограммы ее опрыскивали 20 %-ным раствором трихлорида сурьмы в тетрахлориде углерода и нагревали до 110°C. О подделке говорит присутствие пятен с  $R_f$  от 0,4 до 0,55. Экстракт корней *Radix pimpinellae* дает в этой области только одно пятно с  $R_f$  0,45, тогда как экстракт корней *Heracleum* дает четыре пятна.

Чеше и др. [97] применили препаративную ТСХ для выделения нового кумарингликозида из *Daphne mezereum*. Вульфсон и др. [98] хроматографировали на силикагеле ряд кумариновых и фуранокумариновых соединений, используя как растворитель смесь эфира и петролейного эфира в соотношении 1:1. В корнях *Peucedanum morisonii* найдены изоимператорин и пеucedанин. Хсу и Фу [99] хроматографировали кумароны на



силикагеле, изучив влияние различных факторов на разделение. Удовлетворительное разделение получено на кислом оксиде алюминия с частицами размером 100 меш при элюировании пробы смесями петролейный эфир—хлороформ (1:1), петролейный эфир—этанол (1:1) или петролейный эфир—диоксан (5:1), причем достижения равновесия хроматографической пластинки с парами растворителя не требовалось Вейганд и др. [100] исследовали биосинтез кумарина. Копенхеве и Карвер [101] разделили смесь 13 кумариновых соединений с 3 элюирующими системами на слоях силикагеля. Чернобай и Колесников [102] анализировали группу кумаринов *Cnidium bibium* хроматографированием на оксиде алюминия, обработанном кислотой. Из плодов этого растения выделены энидин, энидицин и энидилилин

Герлих [103] разделил флавоноиды олеандра (*Nerium oleander*) методом хроматографии на бумаге и методом ТСХ. В последнем случае анализ был выполнен на силикагеле при элюировании смесью этилацетат—муравьиная кислота—вода—метанол (10:2:2:1).

Стамбули и Парис [104] исследовали флавоноиды платана (*Platanus occidentalis*) методом ТСХ на силикагеле и хроматографии на бумаге.

Рибери-Гейон [105] идентифицировал четыре флавоноида, выделенных из кожицы красных сортов винограда (*Vitis*).

Габор и др. [106] использовали смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) для разделения биофлавоноидов на силикагеле, а Лин и Чен [107] привели величины  $R_f$  18 биофлавоноидов и их метилпроизводных, полученные при элюировании на силикагеле смесью бензол—пиридин—муравьиная кислота (36:9:5 и 40:10:2).

Дененс и Ван Бовен [108] опубликовали величины  $R_f$ , полученные на обычном силикагеле и на силикагеле, обработанном фосфатным буферным раствором, при элюировании смесями хлороформ—метанол (97:3) и соответственно хлороформ—бензол—муравьиная кислота—ацетилацетон (49:48:2:1). Трковник и др. [109] разделили на силикагеле четырнадцать 3-замещенных 4-оксикумаринов, элюируя пробы смесями хлороформ—метанол—толуол (33:7:10), бензол—легкий петролейный эфир—ацетон—этанол (61:23:8:8), бензол—ацетон (9:1), бензол—метилэтилкетон (9:1), бензол—уксусная кислота—ацетон (17:1:2), а также бензол—уксусная кислота—метилэтилкетон (8:1:1). В работе [109] приведены величины  $R_f$ .

Флавоноиды хроматографировали также на слоях полиамида. Давидек [110], а также Давидек и Давидкова [111] показали эффективность применения незакрепленных слоев полиамида для анализа флавоноидов. Давидек и Прохазка [112]

опубликовали данные о разделении рутина, кверцетина и нарингина. На слоях полиамида с элюирующим растворителем метанолом они получили следующие величины  $R_f$ : рутин 0,45, кверцетин 0,20 и нарингин 0,79, а при элюировании смесью метанол—вода (4:1) — 0,45, 0,10 и 0,80 соответственно. Осторожно опрыскивая пластинки с такого расстояния, чтобы не повредить незакрепленные слои, можно обнаружить пятна этих соединений с помощью реагента на основе диазотированной сульфаниловой кислоты. Давидек [110] определил содержание рутина и кверцетина в соцветиях бузины и стеблях гречихи, элюируя пятна с хроматограмм 30 %-ным метанолом и проводя количественное определение колориметрически после реакции с диазотированной *n*-аминобензойной кислотой. Чиа [113] разделил 11 различных видов флавоноидов на слоях полиамида, используя ряд различных растворителей, в том числе насыщенный водой этилацетат, смеси насыщенный водой *n*-бутанол—уксусная кислота (100:1 и 100:2), ацетон—вода (1:1), ацетон—95 %-ный этанол—вода (2:1:2), 95 %-ный этанол—уксусная кислота (50:1) и изопропанол—вода (3:2). Эггер [114] анализировал группу из 14 флавоноидов как методом хроматографии на бумаге, так и методом ТСХ на полиамиде. В табл. 28.4 даны величины  $R_f$ , полученные на полиамиде с тремя различными растворителями. Бхандари [115] использовал полиамид для разделения флавоноидов хмеля. Таким способом удалось разделить шесть флавоноидов, из которых три были идентифицированы. Впервые был найден астралигин, однако наличие кверцетина, о котором ранее сообщалось, не было подтверждено. Как оказалось, при хроматографировании пива наблюдаются те же пятна, что и при хроматографировании экстрактов хмеля. Губачек [116] хроматографировал флавоноиды хмеля на слоях полиамида, элюируя пробу на 15 см смесью метанол—вода (4:1). Хёрхаммер и др. [117] анализировали на полиамиде флавонолгликозиды *Matricaria chamomilla*. Нишиура и др. [118] использовали смесь нитрометан—метанол (5:2) как растворитель для разделения на полиамиде изомерных пар рутинозида и неогесперидозида. Эти соединения обнаруживали, опрыскивая пластинки 2 %-ным раствором борогидрида натрия в метаноле и выдерживая их затем в парах соляной кислоты, в результате на хроматограмме появлялись пятна, окрашенные в цвета от красного до фиолетового.

Гризебах и др. [119—122] использовали тонкослойную хроматографию при изучении биогенеза изофлавонов. 5,7-Диокси-4'-метоксиизофлавонон и 7-окси-4'-метоксиизофлавонон, которые не удается разделить хроматографией на бумаге, легко разделяются на тонком слое силикагеля при элюировании смесью бензол—этанол (92:8); при этом их величины  $R_f$  соответственно равны 0,4 и 0,25. Эти соединения были выделены

Таблица 284

Величины  $R_f \times 100$  некоторых флавонолгликозидов, полученные на слоях полиамида и на бумаге [114]<sup>а</sup>

Соединение <sup>б</sup>	Перлон <sup>в</sup>			Бумага <sup>г</sup>	
	А	Б	В	Г	Д
K-3-rh	22	22	15	73	64
K-3-arab	22	22	15	72	60
K-3-gluc	22	22	15	62	54
K-3-rhgluc	32	37	27	52	48
K-3-digluc	39	51	32	20	28
K-3,7-digluc	57	63	53	30	31
K-3-rhgal-7-rh	66	65	60	35	51
Q-3-rh	22	22	15	60	48
Q-3-gluc	22	22	15	51	42
Q-3-rhgluc	32	39	29	40	40
My-3-rh	22	22	15	48	33
My-3-gluc	22	22	15	35	25

<sup>а</sup> С разрешения автора и Springer-Verlag.

<sup>б</sup> K — кемферол, Q — кверцетин, My — миррицетин, rh — рамнозид, arab — арабинозид, gluc — глюкозид, gal — галактозид

<sup>в</sup> Растворители: А — этанол—вода (3:2); Б — вода—этанол—ацетилацетон (4:2:1); В — вода—этанол—метилэтилкетон—ацетилацетон (13:3:3:1).

<sup>г</sup> Г — смесь Партриджа; Д — насыщенная водой смесь хлороформ—уксусная кислота (2:3).

из ростков турецкого гороха (*Cicer arietinum*). Гризебах и Барц [120] использовали препаративную ТСХ при изучении биогенеза 3-арилкумаринкумэстрола в люцерне (*Medicago sativa*).

Бикофф и др. [123—125] выделили смесь четырех изофлавонов из люцерны (*Medicago sativa*), красного клевера (*Trifolium pratense*) и подземного клевера (*Trifolium subterraneum*). Клевер ладино (*Trifolium repens* var. *ladino*) содержит только три изофлавоны этой группы и не содержал биоханина А. Разделение проводили на хроматографических полосках с силикагелем [83] с несколькими растворителями (табл. 28.5). Положения пятен на хроматографических полосках фиксировали по флуоресценции при УФ-облучении.

Ларсон [126] хроматографировал соединения группы флавонона на магнезоле—кислом силикате магния. Растворителем

Таблица 285

Величины  $R_f \times 100$  четырех изофлавонов, полученные на хроматографических полосках с кремневой кислотой с различными растворителями [123]<sup>а</sup>

Растворители	Изофлавоны <sup>б</sup>			
	даидзеин	формононетин	генистеин	биоханин А
Этилацетат—скеллизольв В (3:1)	76	88	78	82
Этилацетат—скеллизольв В (1:1)	38	56	50	61
Ацетон—этилацетат—скеллизольв В (4:3:3)	81	95	80	90
Этанол—хлороформ (1:3)	62	81		71
Этанол—хлороформ (1:1)	84	95	68	82
Диэтиловый эфир—скеллизольв В (7:3)			36	60

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Amer. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Даидзеин—4',7-диоксиизофлавоны; формононетин—7-окси-4'-метоксиизофлавоны; генистеин—4',5,7-триоксиизофлавоны; биоханин А—5,7-диокси-4'-метоксиизофлавоны.

служила смесь толуол—этилформиат—муравьиная кислота (5:4:1), элюирование велось в насыщенной атмосфере. Ларсон утверждает, что данный растворитель — наилучший для разделения этих соединений на силикагеле, полиамиде или целлюлозе. Уанг [127] нашел, что на оксиде алюминия достигается лучшее отделение даидзина от генистина и рекомендует оксид алюминия в качестве адсорбента при разделении изофлавонов с гидроксидом в положении 5 и изофлавонов, в которых эта группа отсутствует. В качестве элюирующего растворителя этот автор выбрал смесь хлороформ—метанол—вода (65:25:4).

## 5. АНТОХЛОРЫ

Хензель и др. [128] синтезировали ряд аурунов и хроматографировали их на тонких слоях силикагеля G, обработанного буферным раствором ацетата натрия, элюируя пробы смесями

бензол—этилацетат—уксусная кислота (4,5:3,5:2,0), хлороформ—этилацетат—муравьиная кислота (5:4:1 и 6:3:1), а также толуол—этилформиат—муравьиная кислота (5:4:1). На слоях силикагеля, пропитанных водой, хроматографировали также смесь хальконов, используя в качестве растворителя смесь циклогексан—этилацетат (7:1), насыщенную смесью 5 мл воды и 10 мл формамида. Хальконы и ауроны можно различить по их реакции на облучение, вызывающее флуоресценцию: ауроны при УФ-облучении дают флуоресценцию от желтого до светло-зеленого цвета, в то время как хальконы дают темно-коричневую флуоресценцию. Эти соединения еще легче различить, если выдержать пластинку в парах аммиака: ауроны при этом окрашиваются в оранжевый цвет, а хальконы в густо-красный. Кауфман и Эль Бая [129] разделяли антохлоры *Dahlia variabilis* и *Cosmos sulphureus* на силикагеле смесью бензол—этилацетат—муравьиная кислота (9:7:4). Пробы гликозидов элюировали смесью этилацетат—метилэтилкетон—муравьиная кислота—вода в (5:3:1:1).

## 6. ПОРФИРИНЫ

Демоль [6] разделил несколько порфириновых эфиров на тонких слоях кремневой кислоты, закрепленных крахмалом, элюируя пробу на 5,4 см смесью бензол—этилацетат—этанол (90:20:7,5). При этом были получены следующие величины  $R_f$ : копропорфириновый эфир I 0,68, копропорфириновый эфир III 0,63, уропорфириновый эфир I 0,33, дейтеропорфириновый эфир 0,80 и протопорфириновый эфир 0,85. Для свободных копропорфиринов I и III Йенсен [130] получил  $R_f$  0,19 и 0,25 на тонких слоях силикагеля G при элюировании пробы смесью 2,6-лютидин—вода—гидроксид аммония. Этот растворитель готовляли, смешивая 10 мл 2,6-лютидина с 3 мл воды; затем смесь помещали в хроматографическую камеру и приводили в равновесие с парами аммиака, источником которых был 30 %-ный раствор гидроксида аммония, находившийся внутри камеры в отдельном сосуде.

Досс и соавторы опубликовали много работ по ТСХ порфиринов, некоторые из их статей указаны в списке литературы [131—136]. В качестве адсорбента они выбрали слои силикагеля, а в качестве элюирующего растворителя—смесь бензол—этилацетат—метанол (170:27:3). Во многих случаях порфирины разделяли в виде метиловых эфиров, которые получали, обрабатывая пробу 5 %-ным раствором серной кислоты в метаноле в течение 6 ч при комнатной температуре. При проведении количественных определений слои адсорбента предварительно элюировали смесью хлороформ—метанол сначала с со-

отношением компонентов 2:1, а затем с соотношением 1:2 и после этого сушили при 80°C. Элюируя пробу смесью петролейный эфир—диэтиловый эфир (7:3), можно выделить глицериды, холестеринные эфиры и метиловые эфиры жирных кислот [132]. Количественный анализ порфиринов выполняли путем флуориметрического исследования пятен *in situ* [131, 132, 136]. Досс [134] показал также, что устойчивость и молярная экстинкция порфиринов возрастают при введении цинка в кольцо. Хелатные эфиры хроматографировали в таких же условиях. Мундшенк [137—140] использовал для разделения свободных порфиринов смеси 2,6-лютидин—вода с соотношением компонентов 62,5:37,5; 66,2:33,8 и 70:30. Элфолк и Сиверс [141] хроматографировали свободные порфириновые кислоты на нейтральных и кислых слоях силикагеля. При разделении на нейтральных слоях к смесям бензол—метанол (17:3) и хлороформ—метанол (9:1) прибавляли муравьиную кислоту в таком количестве, чтобы ее концентрация в полученном элюирующем растворителе равнялась 0,3 моль/л. На кислых слоях, приготовленных посредством обработки силикагеля щавелевой кислотой, применяли как растворители смеси толуол—изопропанол (1:1), бензол—метанол (6:4), а также смеси бензола с другими спиртами. Эльдер [142] проводил двумерное разделение метиловых эфиров на силикагеле. В одном направлении он элюировал пробу смесью тетрахлорид углерода—дихлорметан—метилацетат—метилпропионат (2:2:1:1), в другом сначала смесью бензол—бутанон (40:3), а затем смесью хлороформ—керосин—метанол (200:100:7). Разрешение порфиринов с большими  $R_f$  можно улучшить, повторив элюирование смесью бензол—бутанон и затем смесью хлороформ—керосин—метанол (200:100:15).

При разделении порфиринов в качестве адсорбента применяли также целлюлозу и такие системы растворителей, как 2,6-лютидин—вода (10:3) [143], 2,6-лютидин—аммиак—вода—0,1 М раствор EDTA (10:4,2:2,8:0,02) [144] и 2,6-лютидин—вода (10:3); разделение последней смесью проводилось в парах аммиака [145]. Батл и Бенсон [146] разделили октаметиловые эфиры уропорфирина I и III хроматографированием на целлюлозе с 10 % гипса, элюируя пробу смесью керосин—диоксан (4:1,5).

И свободные, и этерифицированные порфирины хроматографировали на тонких слоях талька. Элюирующими растворителями для разделения свободных порфиринов служили следующие смеси: ацетон—0,5 М соляная кислота (3:2) [147], такая же смесь, но с соотношением компонентов 7:3 [148] и этанол—2,6-лютидин—вода (30:3:67) [149]. Для разделения порфириновых эфиров применяли смеси уксусная кислота—пиридин—

ацетон (1:1:1), хлороформ—метанол (1:1), также этилацетат—этанол (2:3).

Эриксен [150] использовал для разделения порфиринов электрофорез на тонких слоях геля агар.

Гемоглобин—сопряженные белки, содержащие глобины и гем (пигмент), состоящий из протопорфирина и двухвалентного железа), анализировали на слоях оксида алюминия и диэтил-аминоэтилцеллюлозы, а также посредством электрофореза на геле крахмала [151—153]. Довольно широко применялся для разделения гемоглобинов тонкослойный электрофорез на агаре [154—157] и на крахмале [151, 158—163]. Шредер и Нельсон [164] применяли для хроматографии гемоглобинов ионообменные слои карбоксиметилцеллюлозы CM-52 (Whatman).

## 7. ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Демоль [6] хроматографировал биливердин и билирубин на слоях кремневой кислоты смесью бензол—этилацетат—этанол (90:20:7,5) при длине пути элюирования 5,4 см и получил  $R_f$  0,06 и 0,92 соответственно. О'Карра и Коллеран [165] разделяли на силикагеле G изомеры протобиливердина и мезобиливердина IX $\alpha$ , IX $\beta$ , IX $\gamma$  и IX $\delta$  в виде их диметилловых эфиров. Наилучшие результаты получены при многократном (8 $\times$ ) элюировании смесью тетрахлорид углерода—этилацетат—циклогексан (32:9:4). Пропиловые или изопропиловые эфиры разделяли при четырехкратном элюировании смесью гептан—метилэтилкетон (5:2) или циклогексан—метилэтилкетон (2:3) [166]. В число других растворителей, применявшихся для разделения билирубина и его производных на силикагеле, входят следующие смеси: хлороформ—этилацетат (5:3) [167], хлороформ—метанол—муравьиная кислота (60:30:1) и метилацетат—метилпропиловый эфир—тетрахлорид углерода—дихлорметан (1:1:1:1) [168]. Петрика и Уотсон [169] хроматографировали неэтерифицированные желчные пигменты на полиамиде смесью метанол—вода (3:1) или метанол—10 %-ный аммиак—вода (9:1:2). Этерифицированные образцы разделяли на силикагеле G смесями бензол—этанол (25:2) и хлороформ—этанол (50:1). Сегура-Кардона [170] использовал полиамид и смесь пропанол—*n*-бутанол—пиридин—вода (10:3:4:1) для разделения желчных пигментов сыворотки. Петрика [171] использовал для количественной оценки содержания желчных пигментов денситометрический метод *in situ*.

Тенхунен [172] связывал желчные пигменты диазотированной сульфаниловой кислотой и затем наносил на силикагель полученные азопигменты в виде раствора в бутаноле. Для элюирования он применял 50 %-ный метанол.

## ЛИТЕРАТУРА

- Mottier M., Poterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 118 (1952).
- Mottier M., Poterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 123 (1952).
- Mottier M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 47, 372 (1956).
- Lagoni H., Wortmann A., Milchwissenschaft, 10, 360 (1955).
- Lagoni H., Wortmann A., Milchwissenschaft, 11, 206 (1956).
- Demole E., J. Chromatogr., 1, 24 (1958).
- Voelkar O., Naturwissenschaften, 48, 581 (1961).
- Thommen H., Wackernagel H., Biochim. Biophys. Acta, 69, 387 (1963).
- Thielemann H., Z. Anal. Chem., 271, 285 (1974).
- Winterstein A., Hegedues B., Chimia (Aarau), 14, 18 (1960).
- Winterstein A., Hegedues B., Z. Physiol. Chem., 321, 97 (1960).
- Thommen H., Naturwissenschaften, 49, 517 (1962).
- Thommen H., Chimia (Aarau), 15, 433 (1961).
- Wildfeuer I., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 140, 140 (1969).
- Winterstein A., Studer A., Rueegg R., Chem. Ber., 93, 2951 (1960).
- Box J. A., Boekenoogen H. A., Fette, Seifen, Anstrichm., 69, 724 (1967).
- Bjornland T., Aguilar-Martinez M., Phytochemistry, 15, 291 (1976).
- Sherma J., Anal. Lett., 3, 35 (1970).
- Rai H., Lee G. F., Anal. Chem., 36, 2208 (1964).
- Egger K., Planta, 58, 664 (1962).
- Nitsche H., Z. Naturforsch., Teil C, 29, 657 (1974).
- Isler O., Rueegg R., Schudel P., Chimia (Aarau), 15, 208 (1961).
- Grob E. C., Eichenberger W., Pflugshaupt R. P., Chimia (Aarau), 15, 565 (1961).
- Grob E. C., Pflugshaupt R. P., Helv. Chim. Acta, 45, 1592 (1962).
- Eichenberger W., Grob E. C., Helv. Chim. Acta, 45, 974 (1962).
- Ibid., p. 1556.
- Ibid., 46, 2411 (1963).
- Grob E. C., Boschetti A., Chimia (Aarau), 16, 15 (1962).
- Davies B. H., Goodwin T. W., Mercer H. I., Biochem. J., 81, 40P (1961).
- Grob E. C., Wiss. Veroeff., Dtsch., Ges. Ernaehr., 9, 26 (1963).
- Rispoli G., Di Giacomo A., Boll. Lab. Chim. Prov., (Bologna), 13, 587 (1962); Chem. Abstr., 59, 8044 (1963).
- Benk E., Wolff I., Treiber H., Deut. Lebensm. Rundsch., 59, 39 (1963).
- Montag A., Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 116, 413 (1962).
- Corbi D., Giorn. Med. Mil., 114, 168 (1964).
- Duquenois P., Meylaender M., Ann. Fals. Expert. Chim., 56, 371 (1963).
- Davies B. H., Jones D., Goodwin T. W., Biochem. J., 87, 326 (1963).
- Mercer E. I., Davies B. H., Goodwin T. W., Biochem. J., 87, 317 (1963).
- Egger K., Chromatogr. Symp., 2nd, Brussels, 1962, 75.
- Cholnoky L., Szaboles J., Cooper E. D. G., Weedon B. C. L., Tetrahedron Lett., 1963, 1257.
- Bolliger H., Koenig A., Schwieter U., Chimia (Aarau), 18, 136 (1964).
- Egger K., Voigt H., Z. Pflanzenphysiol., 53, 64 (1965).
- Hager A., Stransky H., Arch. Mikrobiol., 73, 77 (1970).
- Stransky H., Hager A., Arch. Mikrobiol., 72, 84 (1970).
- Hager A., Stransky H., Arch. Mikrobiol., 72, 68 (1970).
- Stransky H., Hager A., Arch. Mikrobiol., 71, 164 (1970).
- Stobart A. K., McLaren I., Thomas D. R., Phytochemistry, 6, 1467 (1967).
- Philip T., Francis F. J., J. Food Sci., 36, 823 (1971).
- Singh H., John J., Cama H. R., J. Chromatogr., 75, 146 (1973).
- Knowles R. E., Livingston A. L., J. Chromatogr., 61, 133 (1971).
- Rollins C., J. Chem. Educ., 40, 32 (1963).
- Fieser L. F., Chemistry, 37, 23 (1964).

52. Hager A., Bertenrath T., *Planta*, **58**, 564 (1962).
53. Rahman A. K., Egger K., *Z. Naturforsch.*, Teil C, **28**, 434 (1973).
54. Forpen F. H., *Chromatogr. Rev.*, **14**, 133 (1971).
55. Вакулова Л. А., Кузнецова В. П., Колот Ф. Б., Бабьева И. П., Самохвалов Г. И., *Микробиология*, **33**, 1061 (1964).
56. Garside C., Riley J. P., *Anal. Chim. Acta*, **46**, 179 (1969).
57. Colman B., Vishniak W., *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 616 (1964).
58. Nutting M. D., Voet M., Becker R., *Anal. Chem.*, **37**, 445 (1965).
59. Jones I. D., Butler L. S., Gibbs H., White R. C., *J. Chromatogr.*, **70**, 87 (1972).
60. Daley R. J., Gray C. B. J., Brown S. R., *J. Chromatogr.*, **76**, 175 (1973).
61. Shimizu S., Fukushima H., Tamaki E., *Phytochemistry*, **3**, 641 (1964).
62. Anwar M. H., *J. Chem. Educ.*, **40**, 29 (1963).
63. Bacon M. F., *J. Chromatogr.*, **17**, 322 (1965).
64. Schneider H. A. W., *J. Chromatogr.*, **21**, 448 (1966).
65. Loewenschuss H., Wakelyn P. J., *Anal. Chim. Acta*, **63**, 230 (1973).
66. Nybom N., *Physiol. Plantarum*, **17**, 157 (1964).
67. Nybom N., *Fruchtsaft-Ind.*, **8**, 205 (1963).
68. Paris R. R., Paris M., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 1597.
69. Gupta S. B., *J. Chromatogr.*, **36**, 115 (1968).
70. Mullick D. B., *J. Chromatogr.*, **39**, 291 (1969).
71. Barritt B. H., Torre L. C., *J. Chromatogr.*, **75**, 151 (1973).
72. Wroldstad R. E., *J. Chromatogr.*, **37**, 542 (1968).
73. Loomis W. D., Battaile J., *Phytochemistry*, **5**, 423 (1966).
74. Mullick D. B., *Phytochemistry*, **8**, 2003 (1969).
75. Nybom N., *J. Chromatogr.*, **38**, 382 (1968).
76. Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H.-A., Suppan F., *Z. Naturforsch.*, **17B**, 352 (1962).
77. Tenner H., Rentschler H., Senn G., *Mitt. (Klosterneuberg), Ser. A, Rebe Wein*, **13**, 156 (1963); *Chem. Abstr.*, **59**, 13094 (1963).
78. Hess D., Meyer C., *Z. Naturforsch.*, **17B**, 853 (1962).
79. Asen S., *J. Chromatogr.*, **18**, 602 (1965).
80. Stanley W. L., Vannier S. H., *пат. США 2889337* (June 2, 1959).
81. Stanley W. L., Vannier S. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3488 (1957).
82. Miller J. M., Kirchner J. G., *Anal. Chem.*, **24**, 1480 (1952).
83. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
84. Stanley W. L., Vannier S. H., *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **40**, 582 (1957).
85. Vannier S. H., Stanley W. L., *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **41**, 432 (1958).
86. Swift L. J., *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 99 (1967).
87. Hoerhammer L., Wagner H., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **102**, 759 (1962).
88. Fisher J. F., Nordby H. E., Kew T. J., *J. Food Sci.*, **31**, 947 (1966).
89. Davis W. B., *Anal. Chem.*, **19**, 476 (1947).
90. Hoerhammer L., Wagner H., Heim K., *J. Chromatogr.*, **13**, 235 (1964).
91. Hoerhammer L., Wagner H., *Arzneim.-Forsch.*, **12**, 1002 (1962).
92. Duggan M. B., *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1098 (1969).
93. Duggan M. B., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **52**, 1038 (1969).
94. Jacquin-Dubreuil A., *J. Chromatogr.*, **71**, 487 (1972).
95. Spiegl P., *J. Chromatogr.*, **39**, 93 (1969).
96. Hoerhammer L., Wagner H., Lay B., *Pharmazie*, **15**, 654 (1960).
97. Tschesche R., Schacht U., Legler G., *Naturwissenschaften*, **50**, 521 (1963).
98. Вульфсон Н. С., Зарецкий В. И., Четверикова Л. С., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1963**, 1503.
99. Hsu T.-R., Fuo F.-Y., Yao Hsueh Hsueh Pao, **11**, 223 (1964); *Chem. Abstr.*, **61**, 7337 (1964).
100. Weygand F., Simon H., Floss H.-G., Mothes U., *Z. Naturforsch.*, **15b**, 765 (1960).
101. Copenhaver J. H., Carver M. J., *J. Chromatogr.*, **16**, 229 (1964).
102. Чернобай В. Т., Колесников Д. Г., *Докл. АН СССР*, **133**, 233 (1960).
103. Goerlich B., *Planta Medica*, **9**, 442 (1961).
104. Stambouli A., Paris R. R., *Ann. Pharm. Fr.*, **19**, 732 (1961).
105. Ribereau-Gayon P., *Compt. Rend.*, **258**, 1335 (1964).
106. Gabor M., Matkovics B., Gondos G., *Pharmazie*, **19**, 785 (1964).
107. Lin Y. M., Chen F. C., *J. Chromatogr.*, **104**, D33 (1975).
108. Daenens P., Van Boven M., *J. Chromatogr.*, **57**, 319 (1971).
109. Trkovnik M., Kuleš M., Tabaković I., Žečević M., *J. Chromatogr.*, **128**, 227 (1976).
110. Davidek J., *Nahrung*, **4**, 661 (1960).
111. Davidek J., Davidková E., *Pharmazie*, **16**, 352 (1961).
112. Davidek J., Procházká Z., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2947 (1961).
113. Chia Y.-F., Yao Hsueh Hsueh Pao, **11**, 485 (1964).
114. Egger K., *Z. Anal. Chem.*, **182**, 161 (1961).
115. Bhandari P. R., *J. Chromatogr.*, **16**, 130 (1964).
116. Hubacek J., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **35**, 3119 (1970).
117. Hoerhammer L., Wagner H., Salfner B., *Arzneim.-Forsch.*, **13**, 33 (1963).
118. Nishiura M., Esaki S., Kamiya S., *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **33**, 1109 (1969).
119. Grisebach H., *Z. Naturforsch.*, **14b**, 802 (1959).
120. Grisebach H., Barz W., *Z. Naturforsch.*, **18b**, 466 (1963).
121. Grisebach H., Brandner G., *Z. Naturforsch.*, **16b**, 2 (1961).
122. Grisebach H., Patschke L., *Chem. Ber.*, **93**, 2326 (1960).
123. Guggolz J., Livingston A. L., Bickoff E. M., *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 330 (1961).
124. Livingston A. L., Bickoff E. M., Guggolz J., Thompson C. R., *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 135 (1961).
125. Lyman R. L., Bickoff E. M., Booth A. N., Livingston A. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 61 (1959).
126. Larson R. L., *J. Chromatogr.*, **43**, 287 (1969).
127. Wang L. C., *Anal. Biochem.*, **42**, 296 (1971).
128. Haensel R., Langhammer L., Frenzel J., Ranft G., *J. Chromatogr.*, **11**, 369 (1963).
129. Kaufmann H. P., El Baya A. W., *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **72**, 372 (1970).
130. Jensen J., *J. Chromatogr.*, **10**, 236 (1963).
131. Doss M., Ulshoefer B., Quast R., *J. Chromatogr.*, **41**, 386 (1969).
132. Doss M., *Z. Anal. Chem.*, **252**, 104 (1970).
133. Doss M., *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 499 (1969).
134. Doss M., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **8**, 208 (1970).
135. *Ibid.*, p. 197.
136. Doss M., Ulshoefer B., Philipp-Dormston W. K., *J. Chromatogr.*, **63**, 113 (1971).
137. Mundschenk H., Fischer J., *Z. Klin. Chem. Biochem.*, **7**, 325 (1969).
138. Mundschenk H., *J. Chromatogr.*, **25**, 380 (1966).
139. Mundschenk H., *J. Chromatogr.*, **37**, 431 (1968).
140. Mundschenk H., *J. Chromatogr.*, **40**, 393 (1969).
141. Ellfolk N., Sievers G., *J. Chromatogr.*, **25**, 373 (1966).
142. Elder G. H., *J. Chromatogr.*, **59**, 234 (1971).
143. Gajdos-Torok M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 925 (1968).
144. Yuan M., Russell C. S., *J. Chromatogr.*, **87**, 562 (1973).
145. Russell C. S., *J. Chromatogr.*, **25**, 163 (1966).
146. Batlle A. M. D. C., Benson A., *J. Chromatogr.*, **25**, 117 (1966).
147. With T. K., *Clin. Biochem.*, **1**, 30 (1967).
148. With T. K., *J. Chromatogr.*, **42**, 389 (1969).
149. Belcher R. V., Smith S. G., Mahler R., Campbell J., *J. Chromatogr.*, **53**, 279 (1970).
150. Eriksen L., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **10**, 39 (1958).

151. *Ejremov G., Vaskov B., Duma H., Andrejeva M.*, Acta Med. Jugosl., 17, 252 (1963); Chem. Abstr., 61, 12305 (1964).
152. *Carrell R. W., Lehmann H., Lorkin P. A., Raik E., Hunter E.*, Nature, 215, 626 (1967).
153. *Huisman T. H. J., Wrightstone R. N.*, J. Chromatogr., 92, 391 (1974).
154. *Дальгелите Р., Юхнявичюте Л., Вайцювенас В.*, Лабор. дело, 1963, № 5, стр. 5.
155. *van Sande M., van Ros G.*, Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 43, 537 (1963).
156. *Yakulis V. J., Heller P., Josephson A. M., Singer L., Hall L.*, Am. J. Clin. Pathol., 34, 28 (1960).
157. *Cradock-Watson J. E.*, Nature, 215, 630 (1967).
158. *Baur E. W.*, J. Lab. Clin. Med., 61, 166 (1963).
159. *Baur E. W.*, Clin. Chim. Acta, 9, 252 (1964).
160. *Baur E. W., Rwoley N. M., Motulsky A. G.*, Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Boulder August 26—28, 1964.
161. *Berkeš-Tomašević P., Rosić J., Berkeš I.*, Acta Pharm. Jugosl., 13, 69 (1963).
162. *Dangerfield W. G.*, Nature, 202, 520 (1964).
163. *Marsh C. L., Jolliff C. R., Payne L. C.*, Tech. Bull. Regist. Med. Technol., 34, 1 (1964).
164. *Schroeder W. A., Nelson N. C.*, J. Chromatogr., 115, 527 (1975).
165. *O'Carra P., Collieran E.*, J. Chromatogr., 50, 458 (1970).
166. *O'Carra P., Collieran E.*, J. Chromatogr., 108, 212 (1975).
167. *Kuenzle C. C., Reuttner J. R., Eugster C. H.*, Helv. Chim. Acta, 53, 1838 (1970).
168. *Berry C. S., Zarembo J. E., Ostrow J. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 1366 (1972).
169. *Petryka Z. J., Watson C. J.*, J. Chromatogr., 37, 76 (1968).
170. *Segura-Cardona R.*, Rev. Espan. Fisiol., 22, 41 (1966).
171. *Petryka Z. J.*, J. Chromatogr., 50, 447 (1970).
172. *Tenhunen R.*, Acta Chem. Scand., 17, 2127 (1963).

## СТЕРОИДЫ

## 1. СТЕРИНЫ И СТЕРИНОВЫЕ ЭФИРЫ

## Разделение свободных стеринов

Стерины — это насыщенные и ненасыщенные спирты, производные основного углеводорода холестерина. Они широко распространены в природе и встречаются как в свободном состоянии, так и в виде производных — сложных эфиров или гликозидов. Разделить стерины часто довольно сложно из-за сходства их химических свойств, а также из-за того, что обычно в продукте находится более одного стерина.

Эвиген и др. [1] разделяли некоторые стерины на силикагеле G, предварительно окрашенном роданином G, элюируя пробы смесью бензол—этилацетат (5:1) на 20 см. Отделение  $\Delta^{5,7}$ -холестадиенола от мононенасыщенных холестеренолов и десмостерина, которое не удается осуществить в этой системе, проводили с тем же растворителем на слоях силикагеля, пропитанных раствором нитрата серебра. Холестерин, десмостерин, 24,25-дигидроланостерин и ланостерин перед разделением необходимо ацетилировать. Полученные ацетильные производные хроматографируют на пластинках длиной 40 см, используя как растворитель смесь гексан—бензол (5:1). На пластинки, предназначенные для разделения указанных соединений, наносят слой кремневой кислоты Малинкродта, просеянной через сито 325 меш; этот адсорбент дает лучшее разделение, чем силикагель G. В качестве связующего добавляют 5% алебаstra. Недавно Клод [2] с помощью этой же системы разделил пропионильные производные холестерина, десмостерина и 5-дигидрохолестерина на пластинках размером 20×20 см. Применение этих производных предпочтительнее, чем применение ацетатов, по следующим двум причинам: 1) соответствующее производное можно получить сразу в результате реакции с пропионилхлоридом, тогда как ацетилирование в пиридине длится 12 ч; 2) пропионаты разделяются быстрее и лучше, чем соответствующие ацетаты. Десмостерин и холестерин хроматографировали также методом непрерывного горизонтального элюирования на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле, используя как растворитель смесь бензол—этилацетат (95:5) [3].

Копиус-Пеереboom и Бикс [4] анализировали стерины на кизельгуре G, элюируя пробы смесью циклогексан—этилацетат

(99,5:0,5). Разделенные вещества обнаруживали опрыскиванием фосфомолибденовой кислотой. В этой системе нельзя отделить холестерин от фитостеринов, и для этой цели используют хроматографирование с обращенными фазами на кизельгуре, пропитанном 10 % ундекана. Удовлетворительные результаты дает смесь уксусная кислота—вода (9:1), насыщенная ундеканом. Ацетаты стеринов разделяли с применением тех же элюирующих растворителей, но взятых в соотношении 92:8. Поскольку в системе с обращенными фазами нельзя разделить критическую пару холестерин—брассикастерин, в этом случае применялся метод бромирования, предложенный Кауфманом и др. [5—7]. Если к растворителю добавляли 0,5 % брома, ацетат брассикастерина бромировался в процессе элюирования и для него относительная величина  $R_{st}$  составляла 1,19 (по отношению к ацетату холестерина).

Айкен и др. [8] бромировали пробу перед хроматографированием, чтобы отделить стеринны от соответствующих станолов. Однако метод Кауфмана более удобен, так как при этом исключается отдельная стадия бромирования. Отделить стеринны от соответствующих станолов можно также на слоях силикагеля, пропитанных раствором нитрата серебра [9]. В этом случае элюирующим растворителем служит хлороформ. В табл. 29.1 даны величины  $R_f$  станолов и бромированных стеринов, полученные в шести различных хроматографических системах, и для сравнения величины  $R_f$ , полученные при разделении на слоях силикагеля, пропитанных раствором нитрата серебра. Идлер и Уайзмен [10] разделяли бромиды стеринов на силикагеле смесию бензол—этилацетат (2:1).

Карджилл [11] применял для разделения стеринов как адсорбционную, так и распределительную ТСХ на силикагеле. Для адсорбционной хроматографии он использовал смеси бензол—этилацетат (2:1 и 19:1), для распределительной хроматографии — гептан в сочетании с 2-фенокси- или 2-метоксиэтанолом (неподвижная фаза, применяемая в виде 15 %-ного раствора в ацетоне), метанол и такие неподвижные фазы, как жидкий парафин (0,5 %-ный раствор в эфире) или ундекан (15 %-ный раствор в петролейном эфире, 40—60°C). С ундеканом в качестве неподвижной фазы применялась также смесь метанол—эфир (49:1). Бромирование для отделения холестерина от холестанола проводилось посредством добавления растворенного в хлороформе брома непосредственно к нанесенной пробе.

Винтьенс и др. [12] анализировали стеринны в условиях программирования состава газовой фазы. Картниг и Микула [13] использовали для разделения свободных стеринов слой оксида магния; пробу они элюировали на 15 см смесью циклогексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (20:79,5:0,5).

Таблица 29.1  
Величины  $R_f \times 100$  станолов и бромированных стеринов, полученные в различных хроматографических системах<sup>а</sup>, а также величины  $R_f \times 100$ , полученные на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра [8, 9]

Стерин или станол	Бензол—этилацетат (2:1)		Бензол—этилацетат (4:1)		Бензол—этанол (19:0,2)		Бензол—этанол (19:0,4)		Хлороформ	
	силикагель G	оксид алюминия G	силикагель G	оксид алюминия G	силикагель G	оксид алюминия G	силикагель G	оксид алюминия G	силикагель G	силикагель, обработанный AgNO <sub>3</sub>
Кампестерин									25	23
Кампестанол									25	26
Холестерин	81 <sup>б</sup>		78 <sup>б</sup>	63 <sup>б</sup>	31 <sup>б</sup>		44 <sup>б</sup>	69 <sup>б</sup>	25	23
Аллохолестерин	95 <sup>б</sup>		92 <sup>б</sup>	77 <sup>б</sup>	43 <sup>б</sup>		58 <sup>б</sup>	82 <sup>б</sup>	29	28
Десмостерин	82 <sup>б</sup>		79 <sup>б</sup>				47 <sup>б</sup>	69 <sup>б</sup>	25	14
Холестанол	62		60	44	19		27	51	25	26
Копростанол	76		66					69	35	42
$\beta$ -Ситостерин	79 <sup>б</sup>		80 <sup>б</sup>	63 <sup>б</sup>	32 <sup>б</sup>		43 <sup>б</sup>	68 <sup>б</sup>	25	23
Стигмастерин	80 <sup>б</sup>		76 <sup>б</sup>	62 <sup>б</sup>			44 <sup>б</sup>	68 <sup>б</sup>	25	23
$\beta$ -Ситостанол	60		59	44	18		27	50	25	32
Ланостерин	57 <sup>б</sup>		77 <sup>б</sup>				59 <sup>б</sup>	81 <sup>б</sup>	42	41
Дигидроланостерин	50 <sup>б</sup>		55					65 <sup>б</sup>	42	45
Агностерин	100		100					94	92	89
Дигидроагностерин									92	95

<sup>а</sup> Хроматографирование велось в насыщенной атмосфере, длина пути элюирования составляла 12 см, только при элюировании хлороформом длина пути равнялась 15 см  
<sup>б</sup> В виде бромпроизводных

Увеличивая длину пути элюирования до 25 см, можно разделить «критические пары» из кампестерина, холестерина и  $\beta$ -ситостерина. Для разделения эфиров пальмитиновой, стеариновой и уксусной кислот использовали смесь петролейного эфира (40—60°C) и ацетона (98:2). Николаидес [14] нашел, что при разделении эфиров воска и стеринов адсорбентом может служить оксид магния, разделение совершалось соответственно степени «плоскостности» молекул. В качестве элюента Николаидес использовал 1 %-ный раствор ацетона в гексане.

Барбье и др. [15] разделили группу стеринов на слоях силикагеля, элюируя пробу смесью циклогексана с этилацетатом (7:3 и 17:3). Айкен и др. [8] применили для разделения свободных стеринов оксид алюминия G и смесь бензол—этанол (19:0,4). В табл. 29.2 собраны величины  $R_f$  и  $R_{st}$ , полученные для группы стеринов в различных хроматографических системах.

Другой метод разделения стеринов с насыщенными и ненасыщенными циклами заключается в окислении ненасыщенного соединения для получения более полярного вещества. Азарнофф и Таккер [16] провели такое окисление: пробу растворяли в 1—2 мл хлороформа и затем обрабатывали при комнатной температуре 5-кратным молярным избытком *m*-хлорпербензойной кислоты. Через 30 мин к смеси добавляли 4 мл диэтилового эфира и промывали 10 %-ным раствором бикарбоната натрия, пока не прекращалось выделение пузырьков. В заключение смесь промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили над безводным сульфатом натрия. Далее хлороформ испаряли, выделившиеся стерины растворяли в бензоле и наносили этот раствор на хроматографические пластинки. С помощью такой операции можно, в частности, отделить холестерин от  $\beta$ -холестанола хроматографированием на слоях силикагеля, высушенных в течение 60 мин при 110°C, применив в качестве элюирующего растворителя смесь бензол—бутилацетат—бутанон (75:25:10). Опыт, проведенный с меченым холестерином, показал, что окисление идет почти количественно. При окислении десмостерина полученный эпоксид имел величину  $R_f$ , близкую к  $R_f$  холестеринэпоксида; это означает, что 24,25-двойная связь в данных условиях не окисляется. В то же время ланостерин после обработки пероксидом дает два новых пятна, следовательно, в данном соединении реакция идет и по 24,25-двойным связям, и по 8,9-двойным связям.

Смит и др. [17] исследовали продукты самопроизвольного окисления холестерина. В качестве элюирующего растворителя они применяли смесь этилацетат—гептан (1:1), а в качестве адсорбента — силикагель. Чтобы улучшить разделение 25-окси-

Таблица 29.2

Величины  $R_{st} \times 100$  и  $R_f \times 100$  некоторых стеринов<sup>a</sup>

Стерины	Кизельгур G <sup>b</sup> [4]	Кизельгур G, пропитанный 10%-ным раствором декана в петролейном эфире <sup>b</sup> [4]		Оксид алюминия G <sup>b</sup> [8]
	А	Б	В	Г
Холестерин	100	100	100	50
$\beta$ -Ситостерин	100	86	83	50
Стигмастерин	100	93	91	52
Дигидрохолестерин	93	90	89	51
Эргостерин	89	116	122	52
7-Дегидрохолестерин	93	112	126	
Зимостерин	102			
Дигидроланостерин	138			77
Ланостерин	137	84	97	78
Агностерин	135	76	86	95
Дигидроагностерин	134			
Брассикастерин		100	100	
Эпихолестерин		90	116	
Копростанол				69
Аллохолестерин				53
21-Норхолестерин				50
Десмостерин				50
$\gamma$ -Ситостанол				49
Кампестерин				50
Кампестанол				51

<sup>a</sup> Растворители: А — циклогексан—этилацетат (99,5:0,5), длина пути элюирования 20 см; Б — уксусная кислота—вода (9:1), насыщенные ундеканом при 22—24°C, 20 см; В — уксусная кислота—вода (92:8), насыщенные ундеканом при 22—24°C, 20 см; Г — бензол—этанол (19:0,4), 12 см.

<sup>b</sup> Величины  $R_{st} \times 100$  относительно холестерина.

<sup>v</sup> Величины  $R_f \times 100$ .

холестерина и 7-оксохолестерина было применено многократное элюирование. При двумерном разделении, когда первое элюирование вели указанным выше растворителем, а второе — смесью ацетон—гептан (1:1), удалось выделить свыше 30 продуктов окисления холестерина. Семь таких соединений удалось



идентифицировать путем сравнения с эталонными образцами стерина (по величинам  $R_f$  и по цветной реакции при опрыскивании серной кислотой). Гидропероксиды стерина идентифицировали с помощью реакции восстановления их боргидридом натрия *in situ* на слое силикагеля с последующим хроматографированием [18]. Восстановленный стеринный спирт более полярнее, чем соответствующий гидропероксид.

Нейвальд и Феттинг [19] изучали продукты окисления холестерина методом хроматографии на слоях силикагеля G, элюируя пробу хлороформом. Для обнаружения пятен пероксидов они использовали реактив Т-207. Эти пероксиды дают на хроматограмме синие пятна с  $R_f$  меньше 0,32, т. е. меньше величины  $R_f$ , полученной в этом растворителе для холестерина, не содержащего пероксид. После опрыскивания хроматограммы 50 %-ным раствором трихлорида сурьмы в азотной кислоте и 10-минутной сушки при 100°C холестерин дает темно-красное пятно. Аккер и Гриве [20] изучали индуцированное радиацией окисление холестерина, содержащегося в продуктах из яичной пасты. Хорват [21], элюируя пробу смесью хлороформ—ацетон (4:1), разделил 22 продукта самопроизвольного окисления холестерина на клиновидных слоях.

Беннетт и Хефтман [22] изучали влияние структурных различий в зависимости от степени их удаления от полярных групп на характер разделения стерина. Эти авторы опробовали различные комбинации растворителей и нашли, в частности, что холестерин и  $\Delta^{16}$ -холестерин можно разделить смесью изооктана и тетрагидрофурана (19:1), но не более полярными растворителями. Соединения, различающиеся по степени ненасыщенности или по положению ненасыщенной связи в кольце В, можно разделить в более полярных растворителях. В частности, смесью циклогексан—этилацетат—вода (600:400:1) можно разделить холестерин и 7-дегидрохолестерин.

Исследованию холестерина и его эфиров, находящихся в липидах сыворотки, посвящен ряд работ [23—28]. Целнер и др. [25] определяли содержание эфиров холестерина в пробе сыворотки объемом всего 0,4 мл. С помощью многократного элюирования тетрагидрофураном на кремневой кислоте можно различить пять таких эфиров; свободный холестерин при этом остается на стартовой линии. Бьюкерс и др. [27] элюировали пробу сыворотки смесью петролейный эфир (60—80°C)—диэтиловый эфир (4:1), с тем чтобы разделить и идентифицировать свободный холестерин и его эфиры. Соответственно возрастанию величин  $R_f$  на силикагеле выделены следующие группы липидов: фосфолипиды, свободный холестерин, триглицериды и эфиры. Клод и Бьюмонт [28] изучали содержащиеся в сы-

воротке стерина, комбинируя фракционирование на колонках с силикагелем и ТСХ. Они объединяли фракции, содержавшие свободные и этерифицированные стерины, гидролизали их и затем переводили в ацетаты для последующего разделения на слоях силикагеля, пропитанных 13,3 %-ным раствором нитрата серебра. Элюирующим растворителем служила смесь гексан—бензол (5:1). Прогестерон, сквален, 7 $\alpha$ -оксихолестерин, холестерин и его эфиры разделяли на силикагеле GF смесью бензол—этилацетат (9:1).

Герц и Гонзалес [29] разделили на силикагеле G несколько моногидроксилированных 5 $\alpha$ - и 5 $\beta$ -холестанолов, используя бензол как растворитель. Холестанолы были разделены методом двукратного элюирования.

Джонсон и др. [30] продемонстрировали наличие холестерина в высших растениях (*Solanum tuberosum* и *Dioscorea spiculiflora*). Чтобы выделить холестерин в чистом виде, они комбинировали газовую и тонкослойную хроматографию.

Копиус-Пеереboom [31] исследовал применение силикагеля G, кизельгура G и оксида алюминия с различными растворителями для разделения ряда масел и жиров, в том числе масла из семян тыквы. Гэд и др. [32] выделили  $\beta$ -ситостерин из масла растущего в Египте *Nigella sativa*. Кирибучи и др. [33] анализировали стерины, содержащиеся в соевых бобах, арахисе, семенах кунжута, рапса, хлопка и сафлора. После предварительного фракционирования на колонках с флоризилом эти авторы провели хроматографирование стерина на силикагеле со смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота—вода в (90:8:1:1). Нагасампаги и др. [34] идентифицировали стерины, содержащиеся в кофе, а Гавеновский и Гиббс [35] выделили холестерин и прогестерон из семян яблок. Вольф и др. [36] использовали ТСХ на оксиде алюминия со смесью бензол—ацетон (19:1) в качестве растворителя для отделения стерина от неомыляемых соединений с целью идентификации масел, применяемых в качестве среды при приготовлении красок.

На пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле авторы работы [37] разделили холестерин и различные изомеры холестеранола; элюирующим растворителем при этом служила смесь гексан—бензол (97:3). На этом же адсорбенте при элюировании пробы смесью хлороформ—ацетон (95:5) разделены свободные стерины, содержащиеся в дрожжах. С этим же растворителем получены аналогичные результаты при разделении на оксиде алюминия, пропитанном раствором нитрата серебра [39]. На оксиде алюминия, пропитанном нитратом серебра, при элюировании пробы смесью хлороформ—ацетон (13:7), в частности, разделены десмостерин и 7-дегидрохолестерин.

Вольфмен и Закс [40] анализировали десмостерин, холестерин и другие стеринны методом хроматографии с обращенными фазами на силикагеле, пропитанном 15 %-ным раствором ундекана в петролейном эфире, используя в качестве элюирующего растворителя смесь уксусная кислота—ацетонитрил (1:1), насыщенную на 70 % ундеканом.

Зеер и Гомберг [41] улучшили разделение стериннов, хроматографируя их 3,5-динитробензоаты. Они применяли клинообразные полоски со слоями смеси оксид магния—оксид алюминия—сульфат кальция (15:5:1) и элюировали пробы смесями гексан—этилацетат с соотношением компонентов 9·1 и 23:2. Таким способом этим авторам удалось провести разделение в соответствии с числом атомов углерода, а также числом и положением двойных связей.

В работе [42] описано определение методом ТСХ стериннов в мягкой пшенице. При этом качественных различий между семью испытанными сортами найдено не было.

Шрейбер и Оске [43] выделили  $\alpha$ -ситостерин из листьев картофеля *Solanum tuberosum*.  $\beta$ -Ситостерин выделили как из листьев картофеля, так и из тканей картофельного жука *Leptinotarsa decemlineata* [44]. Леви и Кейе [45] выделили  $\beta$ -ситостерин и  $\beta$ -ситостанол из древесины *Quassia amara*, а также из древесины деревьев рода *Cabralia*. Айкен и Кешмен [46] обнаружили  $\beta$ -ситостерин и  $\beta$ -ситостанол в торфе. Венцель и др. [47] воспользовались методом Вильцбаха [48, 49] для внесения в холестерин тритиевой метки. Последующую очистку они проводили хроматографированием на силикагеле смесью циклогексан—этилацетат (7:3). Радиоактивность измеряли непосредственно на пластинке проточным газовым счетчиком.

Для обнаружения стериннов Рихтер [50] рекомендует реактив, содержащий нафтохинон и хлорную кислоту (Т-172). Это чувствительный реактив, с помощью которого можно обнаружить 0,03 мкг холестерина. После опрыскивания хроматограммы пластинки нагревают при 70—80°C. Стерины дают на хроматограмме розовые пятна, которые постепенно синеют. При продолжительном нагревании пятна становятся коричнево-черными; то же самое происходит и при нагревании пластинок до более высоких температур, но промежуточной стадии при этом не наблюдается.

### Разделение эфиров стериннов

В природе стеринны встречаются как в свободном виде, так и в виде эфиров, поэтому важно иметь в качестве стандартных веществ чистые эфиры стериннов. Махадеван и Лундберг [51] синтезировали эфиры холестерина с длинноцепочечными жир-

ными кислотами с помощью реакции переэтерификации между ацетатом холестерина и метиловыми эфирами жирных кислот. Чаще всего эти авторы пользовались следующей методикой. Смесь 0,05—0,1 г этилата натрия, 0,01 моль ацетата холестерина и 0,01 моль метилового эфира жирной кислоты помещали в круглодонную колбу емкостью 200 мл с шлифованной пробкой. Колбу продували азотом и нагревали смесь в течение часа при остаточном давлении 20—30 мм рт. ст. при 80—90°C, периодически осторожно взбалтывая. После охлаждения реакционную смесь промывали петролейным эфиром и отфильтровывали нерастворимый осадок. После этого смесь выпаривали досуха, а остаток перекристаллизовывали из подходящего растворителя. Полученные таким образом эфиры хроматографировали на силикагеле G, элюируя пробу смесью петролейный эфир (60—80°C)—бензол (3:2).

Кауфман и др. [52] и Бергман и др. [53], чтобы получить эфиры стериннов, нагревали смесь стерина с жирной кислотой в присутствии катализатора *n*-толуолсульфоновой кислоты в колбе с обратным холодильником. В качестве примера можно привести методику Кауфмана и соавторов. Смесь 0,03 моль холестерина, 0,04 моль жирной кислоты и 1 % *n*-толуолсульфоновой кислоты в 100 мл бензола нагревали в колбе с обратным холодильником 3—4 ч на водяной бане при 80—85°C. После завершения реакции отгоняли под вакуумом 80 % бензола, а остаток растворяли в равном количестве диэтилового эфира. Полученный раствор промывали раствором бикарбоната натрия, а затем водой и сушили 12 ч над сульфатом натрия. После отгонки диэтилового эфира эфир стерина перекристаллизовывали из этанола, ацетона и смеси диэтилового эфира с ацетоном (1:3). Чтобы получить меченые эфиры, Пелик и др. [54] проводили переэтерификацию по методу Махадевана и Лундберга [51]; например, они обрабатывали ацетат холестерина метилпальмитатом, меченным <sup>14</sup>C в положении 1, в присутствии катализатора — метилата натрия. Очищали полученное соединение методом ТСХ на силикагеле смесью петролейный эфир—бензол (3:2).

Ван Дэм и др. [55] хроматографировали с 13 различными растворителями эфиры холестерина и жирных кислот, а также слабополярные  $\beta$ -ацетоксистероидные кетоны на хроматографических полосках и пластинках силикагеля. Полученные величины  $R_f$  даны в форме таблиц. Исследуя липиды сыворотки, Вейкер [26] разделил на силикагеле эфиры стеариновой, олеиновой и масляной кислот, элюируя пробы тетраглюридидом углерода, при этом он получил следующие величины  $R_f$ : 0,5, 0,45 и 0,30. С этим растворителем можно отделить указанные эфиры от других липидов, которые остаются на стартовой линии.

Целнер и др. [25] использовали такую же хроматографическую систему, но увеличили разрешение благодаря многократному элюированию тетрахлоридом углерода.

Бергман и др. [53] получили величины  $R_f$  15 эфиров  $\beta$ -ситостерина, проводя разделение на силикагеле G с 6 различными растворителями (табл. 29.3). Для разделения смесей они применили двумерное хроматографирование, элюируя пробы в одном направлении смесью циклогексан—бензол (2:1), а в другом — смесью тетрахлорид углерода—хлороформ (19:1).

Таблица 29.3

Величины  $R_f \times 100$  эфиров  $\beta$ -ситостерина, полученные на силикагеле G с различными растворителями [53]<sup>a</sup>

Эфиры $\beta$ -ситостерина	Циклогексан—бензол			Тетрахлорид углерода—хлороформ (19:1)	n-Гептан—этилацетат (19:1)	Хлороформ—ацетон (19:1)
	(1:1)	(2:1)	(4:1)			
Ацетат	40	22	19	18	48	83
Пропионат	53	33	26	25	53	84
Бутират	55	36	29	26	56	85
Капроат	70	41	33	31	59	86
Каприлат	75	46	39	37	60	88
Пеларгонат	74	48	40	36	59	87
Капрат	76	50	42	38	62	88
10-Ундеценоат	70	46	35	34	61	87
Лаурат	80	53	43	40	63	90
Мирилат	82	54	44	41	64	90
Пальмитат	85	54	47	43	65	91
Стеарат	88	55	50	44	66	92
Олеат	86	53	45	42	65	91
Линолеат	89	56	52	45	67	92
Арахидонат	92	58	54	49	69	93

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

Кауфман и Макус [52] достигли лучшего разделения эфиров холестерина, проводя в одном направлении адсорбционное хроматографирование, а в другом — хроматографирование с обращенными фазами на соответствующим образом обработанных пластинках. В первом направлении осуществляли разделение элюированием смесью гексан—декалин (7,5:2,5),

после чего погружали неиспользованную часть пластинки в 5 %-ный раствор парафинового масла в петролейном эфире, удаляли растворитель и элюировали пробу смесью метилэтилкетон—ацетонитрил (7:3) под прямым углом к направлению первого элюирования. Михалек и др. [56] также получили отличное разделение эфиров холестерина при хроматографировании на слоях кремневой кислоты, пропитанных 0,5 %-ным раствором парафинового масла в эфире. В этом случае растворителем служила уксусная кислота. Копиус-Пеереboom [57, 58] предпочитает в качестве пропитывающего растворителя ундекан, чтобы избежать затруднений, связанных с удалением парафиновых или силиконовых масел, которые мешают обнаружению некоторых компонентов, содержащихся в малых количествах в смесях ацетатов стерина. Этот автор пропитывал кизельгур G 10 %-ным раствором ундекана (190—220°C) в легком петролейном эфире и после испарения растворителя придавал пластинкам клиновидную форму. В качестве элюирующего растворителя он использовал насыщенную ундеканом смесь уксусная кислота—ацетонитрил (1:3). Для разделения «критических пар» применяли предложенный Кауфманом и др. [6] метод бромирования, добавляя к растворителю 0,5 % брома. Бромированные стерины обнаруживаются в виде ярко-синих полос после опрыскивания 50 %-ным раствором трихлорида сурьмы в азотной кислоте. В указанных условиях не бромится двойная связь  $\Delta^{5(6)}$ . Соединения с сопряженными двойными связями в ядре полностью разлагаются и дают ярко-синюю полосу только у фронта растворителя. Подобной атаке подвергались не сопряженные двойные связи и в других положениях, в результате чего у фронта растворителя также появлялось синее пятно. Чтобы облегчить разделение ненасыщенных эфиров, слою адсорбента пропитывали раствором нитрата серебра [58], а в качестве растворителей использовали смесь хлороформ—диэтиловый эфир—уксусная кислота (97:2,3:0,5) и смесь хлороформ—легкий петролейный эфир—уксусная кислота (25:75:0,5). Этим методом анализировали фитостерин, содержащиеся в семенах тыквы [59]. Капелла и др. [60] разделяли смеси тритерпеновых спиртов и стерина также на слоях, пропитанных раствором нитрата серебра.

Беннет и Хефтман [61] анализировали на пластинках с анализом В (Analabs) ацетаты  $\beta$ -ситостерина, холестерина и стигмастерина, проводя непрерывное элюирование в течение 120 мин. Лис и др. [62] методом непрерывной горизонтальной ТСХ разделяли ацетаты холестерина и десмостерина на силикагеле G, элюируя пробы смесью бензол—гексан (1:3). Зеер и Гомберг [63] выделяли из растительных масел и идентифицировали ацетаты стерина на клиновидных хроматографических слоях

смеси оксид магния—оксид алюминия—сульфат кальция (15:5:1), используя в качестве растворителя смесь гексан—диэтиловый эфир (19:1). Разделение в указанных условиях было хорошим, «критические пары» не возникали. Ацетаты стеринов хроматографировали также на силикагеле Н, пропитанном раствором нитрата серебра, элюируя пробу смесью бензол—гексан (3:5) [64]. Таким способом удалось разделить соединения, различающиеся по числу двойных связей в стероидном ядре или в боковой цепи. Ввиду того что на пропитанном растворе нитрата серебра силикагеле, используя обычные растворители, трудно разделить такие пары стеринов, как  $\beta$ -ситостерин и стигмастерин,  $\Delta^7$ -эргостерин и 5-дигидроэргостерин, ланостерин и агностерин, а также 7-дегидрохолестерин и эргостерин, Копиус-Пееребоом [65] хроматографировал их на таких слоях со смесью хлороформ—петролейный эфир (60—80°C)—уксусная кислота (25:75:0,5), предварительно переводя эти соединения в ацетаты.

Моррис [66] разделял пробы эфиров холестеринов, образующихся в организме человека, на семь компонентов в соответствии со степенью насыщенности соответствующих жирных кислот, используя слои силикагеля, пропитанного раствором нитрата серебра, и эфир, а также смесь эфира с гексаном (1:4).

Хаахти и Никкари [67] исследовали эфиры стеринов и парафины, входящие в состав жиров, выделяющихся на поверхности кожи. Эфиры стерина они отделяли от прочих компонентов на слоях оксида алюминия, элюируя пробу 1 %-ным раствором бензола в гексане. На слоях силикагеля, пропитанного раствором нитрата серебра, удается разделить эфиры стеринов на три фракции: одну насыщенную и две ненасыщенные [68]. Хорлич и Эвиген [69] исследовали стеринны кожи нормальных крыс и крыс, обработанных трипанолом.

#### Количественное определение стеринов и эфиров стеринов

Для определения содержания холестерина и его эфиров применялись различные методы. Перди и Трутер [70] использовали свои методы количественного анализа (основанные на измерении площади пятен; см. т. 1, гл. XI, разд. 3) эфиров холестерина и количественного определения холестерина среди спиртов, выделенных из восков шерсти. Чтобы исключить возможность перекрытия пятен определяемых соединений и других алифатических спиртов, входящих в экстракт, пластинки опрыскивали реагентом Либермана—Бухарда, который готовили, добавляя 10 мл охлажденной льдом серной кислоты к холодной смеси 50 мл хлороформа и 50 мл уксусного ангидрида.

Данные метода, основанного на измерении площади пятен, хорошо совпали с результатами спектроскопического анализа и анализа с применением дигистонина. Целнер [25, 71, 72] испытал ряд методов количественного анализа холестерина и его эфиров. Согласно одному из методов, пластинку равномерно опрыскивали 25 %-ным раствором трихлорида сурьмы в хлороформе и затем нагревали 3—5 мин при 110°C. Окрашенные пятна непосредственно фотометрировали, а площадь под фотометрической кривой тщательно измеряли планиметром. Можно также соскрести окрашенные зоны с пластинки и определить содержание в них холестерина методом Зака и др. [73]. Эффективность последнего метода зависит от количества адсорбированного вещества и скорости, с которой можно отделить адсорбент от растворителя при центрифугировании. Во всяком случае он очень полезен для быстрого получения ориентировочных результатов.

Кауфман и Висванатан [74] описали три метода количественного анализа холестерина и его эфиров после разделения их на слоях силикагеля. Если используется реакция Либермана—Бухарда, пробу взбалтывают с 1 мл хлороформа, 2 мл уксусного ангидрида и 0,25 мл свежеприготовленной смеси уксусной и серной кислот (9:1). Приготовленную смесь выдерживают 13 мин в закрытой пробкой колбе при  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , после чего измеряют поглощение смеси при длине волны 660 нм. Если применяется реактив Чугаева, то пробу вместе с 3 мл хлороформа смешивают с 3 мл свежеприготовленного реактива—смеси 20 %-ного раствора хлорида цинка с уксусной кислотой и ацетилхлоридом, взятых в соотношении 2:1. Реакционную смесь выдерживают в темноте 3 ч, разбавляют хлороформом до объема 10 мл и измеряют ее поглощение в интервале длин волн 520—530 нм. При содержании холестерина от 0,5 до 100 мкг зависимость остается линейной и чувствительность определения составляет 0,5 мкг. Кауфман и Висванатан использовали также метод Златкиса и др. [75], модифицированный Кваифом и др. [76]. В этом случае пробу растворяли в 3 мл 0,05 %-ного раствора гексагидрата хлорида железа (III) в уксусной кислоте и полученный раствор смешивали с 2 мл концентрированной серной кислоты. Смесь выдерживали 30 мин при комнатной температуре и измеряли поглощение при длине волны 560 нм. Кауфман и Висванатан [74] использовали этот метод для определения содержания холестерина и его эфиров в пробах тканей, взятых у пациентов, страдающих различными болезнями. Вагоуни и др. [77] сравнили результаты определения методом, основанным на применении хлорида железа (III), с результатами, полученными методом меченых атомов; совпадение данных было хорошим. Ксенофонта и др. [78] также

обрабатывали пробы гексагидратом хлорида железа (III), чтобы определить содержание  $\beta$ -ситостерина в смесях фитостеринов после осаждения дигитонином и разделения на слоях оксида алюминия.

Самюэль и др. [79] определяли содержание холестерина и копростерина в фекалиях методом меченых атомов, вводя в определяемые соединения  $^{14}\text{C}$  и  $^3\text{H}$ . Хроматографирование эти авторы проводили на силикагеле, элюируя пробу смесью толуол—этилацетат (9:1) на 12 см. При этом были получены следующие величины  $R_f$ : холестерин 0,30; копростерин 0,40; экикопростерин 0,42; копростенон 0,41;  $\Delta^7$ -холестенон-3 $\beta$  0,26; холестанол 0,27; 7-дегидрохолестерин 0,28;  $\beta$ -ситостерин 0,30; стигмастерин 0,31 и 4-холестенон-3 0,50.

Намбара и др. [80] определили содержание  $3\alpha$ -холестанола в присутствии  $3\beta$ -холестанола и холестерина, проводя хроматографирование на силикагеле G со смесью гексан—этилацетат (4:1) в качестве элюирующего растворителя. При количественном определении сначала получали 3,5-динитробензоильный эфир  $3\alpha$ -холестанола, обрабатывая элюат раствором 3,5-динитробензоильного пиридина. Далее эфир экстрагировали гексаном из смеси, а затем обрабатывали этилендиамином и диметилформамидом, чтобы получить окрашенный раствор, поглощение которого измеряли при длине волны 528 нм. Иванов и др. [81] определяли фитостерины колориметрически с помощью сульфосалициловой кислоты после разделения на силикагеле смесью петролейного и диэтилового эфиров (1:1).

Бондьерс и Бьеркеруд [82] использовали флуориметрический метод для определения наногаммовых количеств холестерина и его эфиров после элюирования. Чтобы флуоресценция была достаточно интенсивной, хроматограмму обрабатывали модифицированным реактивом Чугаева и подбирали соответствующие условия реакции. Достаточно надежное извлечение исследуемых соединений с силикагеля достигалось после трехкратного экстрагирования.

Для количественного определения стероидов и их эфиров в пятнах на тонкослойных пластинках применяли также газовую хроматографию. Брандт и Бенвиста [83] пользовались этим методом для определения содержания стероидов в листьях бобов. Пароди [84], выявляя примесь растительного масла в сливочном масле, определял газохроматографически содержание стероидов после их разделения на тонких слоях.

Торп и др. [85, 86] применили такую же методику для обнаружения подделки растительных масел добавкой животного жира. Ремер и Брандт [87] разработали методику систематического анализа стероидов и тритерпенов, основанную на применении ТСХ, ГХ и масс-спектрометрии.

## 2. $\text{C}_{18}$ -СТЕРОИДЫ

### Качественное разделение

Эстрогены — это фенольные соединения, производные углеводорода эстрана, которые могут находиться в моче особой обоего пола.

Лисбоа и Дичфалузи [88] опубликовали методику разделения и идентификации 24 стероидных эстрогенов. Разделение проводят на тонких слоях силикагеля G, высушенных в течение 30 мин при 105°C, со следующими 6 системами растворителей: I) этилацетат—циклогексан—этанол (9:9:2); II) этилацетат—насыщенный водой *n*-гексан—этанол (16:3:1), III) этилацетат—циклогексан (1:1); IV) хлороформ—этанол (9:1); V) этилацетат—насыщенный водой *n*-гексан—этанол—уксусная кислота (72:13,5:4,5:10) и VI) *n*-бутанол, насыщенный водой. Предварительную характеристику пробы получают, хроматографируя ее со смесью этилацетат—циклогексан—этанол (9:9:2), т. е. растворителем I. По результатам этого разделения смеси эстрогенов делят на две группы; более полярную (более низкие величины  $R_f$ ) и менее полярную (более высокие величины  $R_f$ ). После такого предварительного разделения пробу элюируют этанолом, чтобы затем сконцентрировать элюат и осуществить последующее разделение на других пластинках. Соединения более полярной группы можно разделить посредством двумерного элюирования с применением в обоих направлениях растворителя II. Разделение можно несколько улучшить, если элюировать этим растворителем только в одном направлении, а в другом направлении элюировать пробу растворителем V. Пример такого разделения показан на рис 29 1.

Девятнадцать менее полярных эстрогенов, полученных при первоначальном разделении, повторно хроматографируют посредством двумерного элюирования смесью этилацетат—циклогексан (1:1), в результате чего указанные 19 соединений делятся на 8 групп.

Входящие в первую группу эстрон и 2-метоксиэстрон разделяют двумерным хроматографированием с применением растворителей I и III. С целью проведения контрольного разделения эту смесь восстанавливают фторборатом калия, а затем разделяют образовавшиеся при восстановлении эстрадиол-17 $\beta$  и 2-метоксиэстрадиол-17 $\beta$ , элюируя растворителями II и III. Два исходных соединения можно также идентифицировать непосредственно на хроматографической пластинке в виде нитрозных комплексов по методу Бута [89]. При элюировании этих комплексов растворителем II эстроновый комплекс

характеризуется  $R_f$ , равным 0,30, а 2-метоксипроизводный комплекс  $R_f$  0,0.

Вторую группу соединений, состоящую из 16-оксэстрона и эстрадиола-17 $\beta$ , хроматографировали растворителями I и II, а продукты их восстановления легко разделить растворителем III. Третья группа состояла из 7-оксэстрона и 2-метокси-

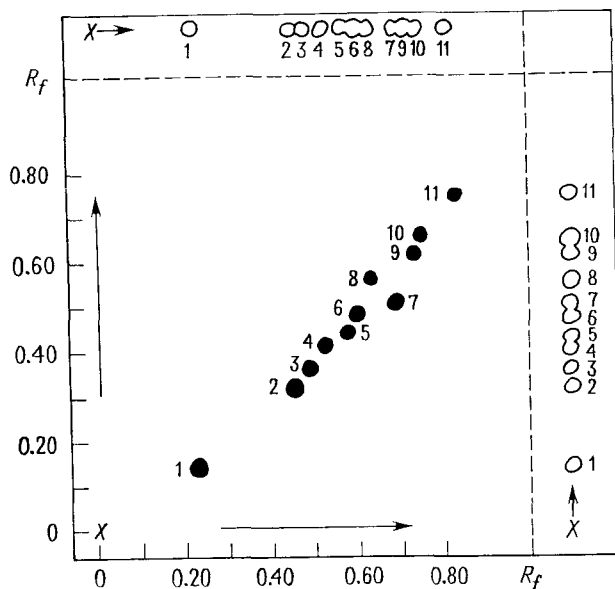


Рис 291 Разделение 4—5 микрограммовых количеств полярных эстрогенов методом двумерной ТСХ [88] (с разрешения авторов и Periodica)

Элюирующие растворители системы В (этилацетат—насыщенный водой и гексан—абсолютный этанол 80/15/5) и Е (этилацетат—насыщенный водой и гексан—абсолютный этанол—ледяная уксусная кислота 72/13,5/4,5/10) адсорбент силикагель G, разделение в камере с насыщенной атмосферой. Эстрогены 1—6 $\alpha$ -оксэстриол, 2—эстриол, 3—16,17-эпиэстриол, 4—16-эпиэстриол, 5—17-эпиэстриол, 6—6 $\alpha$ -оксэстрадиол-17 $\beta$ , 7—2-оксэстрадиол-17 $\beta$ , 8—16 $\alpha$ -оксэстрион, 9—16-оксэстрадиол-17 $\beta$ , 10—эстрадиол-17 $\beta$ , 11—эстрон

эстрадиола-17 $\beta$ , которые нельзя разделить непосредственно. Однако в виде комплекса Жирара 7-оксэстрион можно легко отделить от сопутствующего ему соединения, проведя хроматографирование растворителем VI.  $R_f$  двух гидразонов (0,07 и 0,10) сильно отличаются от  $R_f$  2-метоксиэстрадиола-17 $\beta$  (0,66). Входящие в четвертую группу 6-оксэстрион, 16 $\alpha$ -оксэстрион, 16 $\beta$ -оксэстрион и 16-оксэстрадиол-17 $\beta$  нельзя различить, применяя только одну хроматографическую систему. С помощью растворителя III можно отделить 16 $\beta$ -оксэстрион от остальных трех соединений. 16-Оксэстрадиол-17 $\beta$  можно идентифицировать

по желтой окраске в реакции Кэги—Мишера [90]. Остальные соединения восстанавливают фторборатом калия и хроматографируют продукты восстановления растворителем III. 16 $\beta$ -Оксэстрион и 16-оксэстрадиол-17 $\beta$  образуют один и тот же продукт восстановления (16-эпиэстриол), и, следовательно, их нельзя разделить этим методом. В пятую группу входит только одно соединение, 6-оксэстрадиол-17 $\beta$ , которое можно отделить от соединений четвертой и шестой группы с помощью растворителей I и III. При восстановлении этого соединения фторборатом калия образуется 6 $\alpha$ -оксэстрадиол-17 $\beta$ ; его можно отделить от исходного соединения, используя растворители I, II или III. Три соединения, составляющие шестую группу, а именно 2-оксэстриол-17 $\beta$ , 17-эпиэстриол и 16-эпиэстриол, легко разделить посредством двумерного элюирования сначала растворителем II или IV, а затем, во втором направлении, растворителем V. В седьмую группу входят четыре соединения: 6 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -оксэстрион, 6 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -оксэстрадиол-17 $\beta$ . На первой стадии двумерного разделения отделяют 6-оксэстрионы от соответствующих эстрадиолов растворителем II, а при элюировании во втором направлении с применением растворителя V отделяют 6 $\alpha$ -оксэстрион от соответствующего 6 $\beta$ -соединения. 6 $\alpha$ -Оксэстрадиол-17 $\beta$  нельзя отделить от соответствующего  $\beta$ -соединения ни одной из перечисленных выше растворяющих систем; однако эти соединения удалось разделить методом хроматографии на бумаге, применив смесь насыщенного формамидом хлороформа и этилацетата, взятых в соотношении 5:1 [91]. Наконец, с помощью растворителей I, II или IV можно отделить восьмую группу, состоящую всего из одного соединения, 7 $\alpha$ -оксэстрадиола-17 $\beta$ , от членов седьмой группы. Для разделения других соединений этого класса используют более широкий набор растворяющих систем; значения  $R_f$  для них приведены в табл. 29.4 [92]. Чтобы облегчить идентификацию, Лисбоа и Дичфалузи [93] изучили взаимодействие 32 эстрогенов с различными окрашивающими реагентами.

Барбье и Завьялов [94] использовали смесь пентана и этилацетата в качестве растворителя при разделении нескольких эстрогенов на кремневой кислоте, а Диаманштейн и Лерхер [95] разделили смесь из шести соединений, применив хлороформ как растворитель. Гертеленди и Коммон [96] привели величины  $R_f$  эстриола, 16,17-эпиэстриола, 16-эпиэстриола и 17-эпиэстриола, а также ряда метиловых и диметиловых эфиров этих соединений, полученные с 4 различными растворителями. Те же авторы [97] отделили эквол от эстрона, эстрадиола-17 $\beta$  и эстриола В результате хроматографирования смеси этих соединений на силикагеле G со смесью бензол—метанол (85:15) удалось отделить эквол и эстрадиол-17 $\beta$  в виде одного

Величины  $R_f \times 100$  стероидных эстрогенов, полученные на силикагеле G с различными растворителями [92]

Эстроген	Растворитель <sup>a</sup>													
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Н	О
1,3,5(10)-Эстрадиенол-3	72	63	67	84	61	56	63	76	44					
1,3,5(10),16-Эстратетраенол-3	65	42	63	78	56	51	44	67	18					
16 $\beta$ , 17 $\beta$ -Эпокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-3	69	56	66	80	59	54	47	70	27					
16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -Эпокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-3	67	54	66	79	60	51	47	69	26					
3-Окси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	69	53	65	80	59	51	46	69	20	50	44	60	47	56
3-Окси-1,3,5(10),6-эстратетраенол-17	62			75										
3-Окси-1,3,5(10),7-эстратетраенол-17	68			78										55
3-Окси-1,3,5(10),9(11)-эстратетраенол-17	65	50	64	79	56	52	45	68	17					
3-Окси-1,3,5(10),6,8-эстратетраенол-17	63	47	63	77	58	50	42	65	16					
3-Окси-1,3,5(10)-эстрадиенол-6,17	60	33								30	22	44		38
3-Окси-1,3,5(10)-эстрадиенол-7,17	61	36	55	72	55	44	56							
3-Окси-1,3,5(10)-эстрадиенол-11,17	59	34	61	73			38	58	5					
3-Окси-1,3,5(10)-эстрадиенол-16,17	66	43	64				45			36	39	58	40	44
3,4-Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	54	33	39	76			34	61						
<b>3,6<math>\alpha</math>-Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17</b>	<b>47</b>	<b>13</b>	<b>35</b>	<b>65</b>										
3,6 $\beta$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	46	12	34	62										
3,7 $\beta$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	42	12	40	60	47	30	17	41						
3,7 $\beta$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	43			59										
3,11 $\alpha$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	51													
3,11 $\beta$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	56	27	50	72	51	42	26	54	4					
3,15 $\alpha$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	48	18	46	66	45	30	21	46						
3,16 $\alpha$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	57	32	58	68			33		6	21	21		21	37
3,16 $\beta$ -Диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	55	28												
2-Метилат-2,3-диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	68	50	73	79			66	19	18					
3-Метилат-3,4-диокси-1,3,5(10)-эстрадиенол-17	66	53	76	79										
1,3,5(10)-Эстрадиенол-3,17 $\beta$	61	40	52	74	53	42	30	61	10	30	24	44	25	38
1,3,5(10)-Эстрадиенол-3,17 $\alpha$	61	43	55	75	52	45	34	62	11	35	27	51	30	43
1,3,5(10),6-Эстратетраенол-3,17 $\beta$	57	36	52	73	49	41	29	59	8					
1,3,5(10),7-Эстратетраенол-3,17 $\beta$	57	36	53	74	50	41	30	59	7					

Эстроген	Растворитель <sup>а</sup>													
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Н	О
3,17β-Диокси-1,3,5(10)-эстрагриенон-6	52	23												
3,17β-Диокси-1,3,5(10)-эстрагриенон-7	44		41			40	22	50						
3,17β-Диокси-1,3,5(10)-эстрагриенон-16	59	32	55	69						23	19	40	35	
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-2,3,17β	47	21	24	70				47	2					
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,6α,17β	45	12	23	61			12	44						
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,6β,17β	44	12	23	61			10	43						
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,7α,17β	40	9	22	59	37	24	8	40	0					
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,11β,17β	34	8	29	54	39	20	9	34						
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,16α,17β	29	6	21	48	38	17	7	29		1	2	7		4
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,16γ,17β	43	18	26	54			17							
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,16α,17α	45	20	30	58						8	5	16		15
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,16β,17α	34	8	18	50										
1,3,5(10)-Эстрагриентриол-3,15α,17β	26		16	38						0	2	5		2
2-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-2,3,17β	58	36	58	72	53	45	41	57	8	32	21	37		34
<b>3,16α,17β-Триокси-1,3,5(10)-эстрагриенон-6</b>	21			34				18						
1,3,5(10)-Эстрагриентетрол-3,6,7,17β	23													
1,3,5(10)-Эстрагриентетрол-3,6,16α,17β	12	1	3	24			1	10						
1,3,5(10)-Эстрагриентетрол-2,3,16α,17β	16	5												
3-Окси-16,17-секо-1,3,5(10)-эстрагриен-16-метилоиновая-17 кислоты	31		30	78										
2-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентетрола-2,3,16α,17β	29	6		43			13	26						
3-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-3,6α,17β							31							
3-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-3,6β,17β							28							
3-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-3,16α,17β									3	2	8			
3-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-3,16β,17β									12	5	18			
3-Метилат 1,3,5(10)-эстрагриентриола-3,16α,17α									12	7	20			

<sup>а</sup> Растворители А — этилацетат—циклогексан—этанол (45 : 45 : 10), Б — этилацетат—циклогексан (1 : 1); В — хлороформ—этанол (9 : 1), Г — этилацетат—*n*-гексан—уксусная кислота—этанол (72 : 13,5 : 10 : 4,5); Д — бензол—этанол (4 : 1); Е — бензол—этанол (3 : 1); Ж — хлороформ—этанол (95 : 5); З — этилацетат—*n*-гексан—уксусная кислота (15 : 4 : 1), И — *n*-гексан—этилацетат (3 : 1); К — хлороформ—эфир (3 : 1); Л — бензол—этилацетат (3 : 1); М — бензол—этилацетат (1 : 1); Н — хлороформ—этилацетат (3 : 1); О — бензол—эфир (1 : 1).



пятна от других веществ. После элюирования этого пятна смесь метилировали и вновь хроматографировали смесью бензол—метанол (95:5). При этом диметилловый эфир эквола легко отделяется от 3-метилового эфира эстрадиола-17 $\beta$ .

Фоккенс и Полдермен [98] исследовали методом ТСХ стабильность стероидных препаратов. Чувствительность стероидных соединений к воздействию окислителей можно снизить, добавляя к ним антиоксиданты, например  $\alpha$ -токоферол или пропилгаллат. Кушинский [99] исследовал методом хроматографии на слоях силикагеля устойчивость эстрогенов к действию кислорода и пришел к выводу, что само по себе действие кислорода на эстрогены, находящиеся в тонком слое силикагеля, не вызывает их окисления. Койотупа и др. [100] считают, что разложение эстрогенов вызывается содержащимися в атмосфере примесями и что его можно исключить или уменьшить, работая в атмосфере азота. Дерр [101] разделил пикограммовые количества эстрадиола, добавляя фенол или 2-меркаптоэтанол к элюирующей смеси бензол—этилацетат (3:1) и затем испаряя элюаты током очищенного азота. Гельбке и Кнуппен [102] смогли количественно выделить 2 мкг 2-оксиэстрадиола-17 $\beta$ , хроматографируя пробу на пропитанном аскорбиновой кислотой силикагеле насыщенной аскорбиновой кислотой смесью уксусная кислота—хлороформ—метилциклогексан (1:2:2). Они применяли также такую хроматографическую систему: пропитанный аскорбиновой кислотой оксид алюминия и насыщенная аскорбиновой кислотой смесь 2-бутанон—уксусная кислота (1:1). В обоих случаях к раствору пробы также добавляли аскорбиновую кислоту. Элюировать стероиды следует только хорошо очищенными растворителями, потому что примеси могут вызвать разложение некоторых стероидов [103, 104].

Кроль и др. [105] разделяли стероиды в камере непрерывным элюированием при 4°C смесью циклогексан—хлороформ—триэтиламин—коллидин (670:280:17:46); предварительно на дно камеры наливали смесь циклогексан—хлороформ—коллидин (67:28:10). Они разделяли на слоях силикагеля эстрон, эквипин, эквиленин, эстрадиол-17 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -дигидроэквилин и 17 $\alpha$ -дигидроэквиленин. Чтобы улучшить разделение, применяли также двукратное элюирование при комнатной температуре смесью циклогексан—хлороформ—триметиламин—коллидин (66:29:2:3). В обоих случаях в хроматографическую камеру помещали силикагелевый осушитель для уменьшения влажности. Крокер и Лодж [106] разделяли на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле Н эстрон, эквипин, эквиленин, эстрадиол- $\alpha$ ,  $\alpha$ -дигидроэквилин,  $\alpha$ -дигидроэквиленин, эстрадиол- $\beta$ ,  $\beta$ -дигидроэквилин и  $\beta$ -дигидроэквиленин, четырежды элюируя пробу смесью циклогексан—этилацетат (7:3). При

этом получены следующие величины  $R_f$ : 0,67; 0,48; 0,59, 0,52; 0,19, 0,36; 0,46; 0,21 и 0,34 соответственно. Те же авторы [107] хроматографировали эти эстрогены в виде конъюгатов на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле, элюируя пробу смесью изооктан—хлороформ—этанол (20:35:9). При этом  $\beta$ -эстрадиолсульфат натрия и  $\beta$ -дигидроэквилинсульфат натрия не удалось отделить от соответствующих  $\alpha$ -форм. Абдель-Азиз и Уильямс [107a] обнаружили, что 17 $\alpha$ -этинилэстрадиол и его 3-метилловый и 3-циклопентилловый эфиры разлагаются на слоях адсорбента, пропитанных раствором нитрата серебра.

Дж. Петрович и С. Петрович [108] получили на силикагеле хорошее разделение эстрона и 3-метилловых эфиров эстрона, 16,17-секо-17-оксоэстрон-16-нитрила, 16-оксиминоэстрона и 17 $\beta$ -окси-16-оксиминоэстрона, элюируя пробы смесью бензол—этилацетат (7:1). Они получили следующие величины  $R_f$ : 0,04; 0,26; 0,74; 0,83; 0,46 соответственно. В статье приведены также величины  $R_f$ , полученные с четырьмя другими растворителями. Тачстоун и др. [109], чтобы улучшить разделение на силикагеле эстрогенов, находящихся в экстрактах мочи, элюировали их диизопропиловым эфиром с 20 % ацетона.

Поллоу и др. [110] предварительно элюировали слои силикагеля 5 %-ным раствором пирофосфата натрия, затем сушили их, после чего хроматографировали на них пикограммовые количества эстрадиолов смесью бензол—метанол (19:1), исключив таким образом возможность получения ложных результатов.

Поскольку таких хроматографических систем, пользуясь которыми можно было бы при однократном элюировании разделить все эстрогены, считанное число (если они вообще есть), то более эффективным может оказаться двумерное хроматографирование. Кавина и др. [111] на предварительно покрытых силикагелем 60F<sub>254</sub> пластинках хроматографировали смесь восьми эстрогенов сначала смесью толуол—95 %-ный этанол (9:1) в первом направлении, а затем под углом 90° смесью бутилацетат—уксусная кислота—петролейный эфир (40—70°C) (70:1:30). При этом не удалось разделить только 17 $\beta$ -валерат и 17 $\beta$ -циклопентилпропионат эстрадиола. Тейлор [112] разделил двумерным хроматографированием эстрогены и  $\Delta^4$ -3-оксо-стероиды Адсорбентом служил силикагель, причем элюирование в одном направлении Тейлор проводил смесью хлороформ—метанол—вода (94:6:0,5), а в другом—дважды смесью циклогексан—этилацетат (1:1). Этим методом были разделены 13 стероидов.

Луизи и др. [113] разделили 4 эстрогена методом горизонтальной ТСХ на пластинках с силикагелем G, используя как

элюирующий растворитель смесь циклогексан—этилацетат (35:65).

Смит и Фелль [114] хроматографировали смесь 11 стероидов  $C_{18}$  на силикагеле, закрепленном крахмалом.

Старка [115] анализировал 6 эстрогенов на незакрепленных слоях оксида алюминия (активность IV) с 38 различными растворителями.

Некоторые эстрогены предварительно переводили в соответствующие производные. Пензес и Эртель [116] разделяли на силикагеле азобензол-4-сульфонаты эстрона, эстрадиола и эстриола, элюируя пробу смесями хлороформ—диоксан (94:6), хлороформ—бензол—этанол (18:2:1) и циклогексан—этилацетат (3:1). В ряде случаев изучались также дансилпроизводные эстрогенов; эти производные флуоресцируют и поэтому удобны, в частности, для количественного анализа. Анализировали дансилпроизводные на слоях силикагеля, элюируя смесями хлороформ—бензол—этанол (18:2:1) [117] и этанол—хлороформ (5:95) [118]. Тачстоун и др. [119] хроматографировали на силикагеле производные 11 эстрогенов и красителя прочный фиолетовый, соль В (диазониевая соль 6-бензоиламино-4-метокси-5-толуидина); элюирующим растворителем служил бензол с добавкой 10% метанола и бутилацетат с добавкой 30% бензола. При этом не разделялись производные эстрадиола-16 $\alpha$  и эстрадиола-16 $\beta$ . Описанным способом можно определить до 0,02 мкг эстрадиола.

Лисбоа [120] привел величины  $R_f$  55 эстрогенов, полученные на силикагеле G с 10 системами растворителей, а также величины  $R_f$  ацетатов 18 эстрогенов, полученные с тремя растворителями.

### Количественное определение

Струк [121] обсудил различные методы количественного определения эстрогенов. Для разделения и количественного определения эстрона, эстрадиола и эстриола он использовал слой силикагеля и смесь бензол—этанол (9:1). Чтобы очистить силикагель от мешающих примесей, его выдерживали 12 ч в метаноле, затем фильтровали, дважды промывали свежим метанолом и сушили полчаса при 100°C. Приготовленные таким образом пластинки делили на пять полосок равной ширины. На центральную полоску наносили пробу для количественного определения, по обеим сторонам от нее оставляли чистые полоски, а на наружные полоски наносили такие же пробы. После элюирования на 10 см пластинки сушили 30 мин при 100°C, а затем, чтобы защитить три центральные полоски от попадания обнаруживающего реагента, закрывали их плексигласовой

пластинкой. Две наружные полоски, на которых проводилось обнаружение, сначала опрыскивали дистиллированной водой, потом смачивали 12%-ным раствором пентахлорида сурьмы в тетрахлориде углерода; этим раствором пластинку смачивали с помощью валика, покрытого промокательной или фильтровальной бумагой. Раствор наносили дважды, чтобы слой адсорбента был хорошо смочен. Далее пластинку опять сушили 8—10 мин при 100°C. Используя для ориентировки окрашенные места на наружных полосках, соскабливали те части центральной полоски, где должны находиться соответствующие пятна, а также части двух чистых полосок в центрифужные стаканчики. Экстрагировали исследуемые соединения 30 мин 3 мл свежеприготовленного 0,5 н. раствора гидроксида натрия в 80%-ном этаноле. После охлаждения льдом элюат отделяли от адсорбента центрифугированием при 3000 об./мин в течение 4 мин и осветленный раствор декантировали. После этого измеряли поглощение элюата при 242 нм относительно 0,5 н. спиртового раствора гидроксида натрия. Определив коэффициент поглощения эстрогена, по калибровочной кривой находили содержание эстрогена.

Шредер и др. [122] разработали метод определения эстрона, эквиллина, эквиленина и эстрадиола посредством гидролиза их солей с сульфатом натрия, приготовленных в виде таблеток. После разделения свободных эстрогенов на силикагеле смесью хлороформ—циклогексан—ацетон—58%-ный водный раствор аммиака (30:54:8:8) эквиллин, эстрадиол и эстрол элюировали с пластинок 1%-ным водным раствором гидроксида натрия и измеряли поглощение элюата при 296 нм. Эквиленин экстрагировали метанолом и его содержание определяли по поглощению при 231 нм.

Ливингстон и др. [123] использовали спектрофотометрический метод для количественного определения кумэстрола — природного эстрогена растительного происхождения, содержащегося в клевере ладно (*Trifolium repens*) и других бобовых [124, 125]. После разделения на хроматографических полосках с кремневой кислотой посредством многократного (4 $\times$ ) элюирования смесью эфир—петролейный эфир (7:3) это соединение извлекали с пластинки метанолом и измеряли поглощение элюата при 352 нм.

Содержание эстрогенов, выделенных методом ТСХ, определяли также колориметрически. Луизи и др. [126, 127] применили этот метод для определения содержания эстрогенов в биологических жидкостях. Эстрон, эстрадиол-17 $\beta$  и эстриол элюировали смесью циклогексан—этилацетат (3:17), а если в пробе содержалось слишком много хромогенов, мешающих разделению, то применяли двумерное элюирование, используя

изопропанол в качестве второго растворителя. Количественные измерения проводили по методу Марескотти и др. [128]. Юнг и др. [129] также определяли содержание указанных эстрогенов колориметрически. Генсхирт и Полдермен [130] использовали для обнаружения производных  $\Delta^4$ -17 $\beta$ -оксистерена серную кислоту или раствор ванилина в серной кислоте. Таким методом определяли устойчивость этилэстренола в таблетках.

Вотиз и Чатторай [131] применили ГХ для количественного определения эстрогенов, разделенных методом ТСХ. При тонкослойном хроматографировании они использовали три растворяющие системы. Первая из них, смесь бензол—этилацетат (1:1), применялась для разделения смесей эстрогенов на четыре различные группы; однако если в пробах содержались большие количества андрогенов, то для извлечения этих соединений использовали смесь петролейный эфир—дихлорметан—этанол (10:9:1). Третий растворитель— смесь петролейного эфира и метанола (9:1) использовали в тех случаях, когда нужно было очистить пробу до введения ее в газовый хроматограф. Пластинки для ТСХ покрывали слоем силикагеля G и сушили 3 ч при комнатной температуре. Затем, чтобы удалить примеси из силикагеля, в частности железа, их предварительно элюировали смесью метанол—концентрированная соляная кислота (9:1). После такой обработки пластинки активировали при 105°C. Пробы мочи гидролизуют кислотой, после чего по методу Брауна [132] разделяли на фенольную и нефенольную фракции. Пятна соединений эстрогеновой фракции после разделения элюировали этанолом, растворитель удаляли, а «остаток ацетилировали, растворяя его в смеси пяти частей уксусного ангидрида и одной части пиридина. Эту смесь выдерживали час при 68°C, после чего добавляли к ней 5 мл дистиллированной воды, интенсивно перемешивая стеклянной палочкой». Ацетилированный продукт тщательно экстрагировали петролейным эфиром и промывали полученный экстракт сначала 8 %-ным раствором бикарбоната натрия, а затем водой. После этого петролейный эфир выпаривали досуха, прибавляли свежий петролейный эфир в таком количестве, чтобы можно было перенести полученный раствор в пробирку емкостью по 2 мл. Этот раствор можно вводить в газовый хроматограф. Если же необходима дальнейшая очистка ацетатов, то экстракт хроматографировали на тонкослойной пластинке смесью петролейного эфира и метанола. В газовый хроматограф вводили от 2 до 5 мкл раствора. Колонку (122 см  $\times$  3,2 мм) хроматографа, изготовленную из нержавеющей стали, заполняли 3 % SE-30 (General Electric) на диатопорте (F. and M. Scientific Co.) с частицами размером 80—100 меш. Режим работы был следующим: давление  $N_2$  1,41 кгс/см<sup>2</sup>, давление  $H_2$  0,35 кгс/см<sup>2</sup>,

давление воздуха 0,70 кгс/см<sup>2</sup>, температура колонки 228°C, температура в испарителе 250°C, детектор пламенно-ионизационный. Точность метода не оценивали из-за недостатка экспериментальных данных; однако этот метод представляется весьма перспективным и нижний предел обнаружения стероидов составляет 0,02 мкг, так что вся методика в целом позволяет определять от 0,1 до 0,2 мкг индивидуальных эстрогенов в суточной пробе мочи.

Кнуппен и др. [133] разделили 25 эстрогенов, сочетая хроматографию на бумаге и ТСХ. Стероиды из гидролизованной мочи разделяли сначала на бумаге, пропитанной формамидом, затем разделенные эстрогены ацетилировали и разделяли продукты ацетилирования на тонком слое силикагеля, элюируя смесями циклогексан—этилацетат. Количественное определение ацетатов проводили методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором. Кушинский и др. [134] разделяли эстрон, эстрадиол и эстриол на слоях силикагеля, затем элюировали их и переводили в ацетаты, которые в свою очередь хроматографировали на силикагеле. Разделенные ацетаты элюировали и переводили в гептафторбутираты, содержание которых определяли методом газовой хроматографии. Моретти и др. [135] превращали эстрогены, разделенные в виде эфиров методом ТСХ, в триметилсилиловые эфиры и анализировали газохроматографически. Эти авторы применяли также колориметрический метод. Тачстоун и др. [136] анализировали эстрогены, разделенные на тонких слоях, методом газовой хроматографии, не переводя их предварительно в какие-либо производные.

Применялись также методы определения *in situ* на тонких слоях. Кроль и др. [105] определяли содержание шести эстрогенов, опрыскивая пятна 9 н. серной кислотой и обугливая их при 125°C с последующим сканированием коэффициента отражения. Вортман и др. [137] использовали денситометрический метод для определения содержания эстриола в моче беременных женщин. После выделения эстриола на слоях силикагеля посредством элюирования смесью бензол—этанол (85:15) пятна этого соединения обнаруживали, погружая пластинки в 5 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в метаноле. При денситометрии *in situ* на длине волны 580 нм при содержании эстриола от 0,1 до 1 мкг наблюдалась линейная зависимость оптической плотности от содержания стероида.

Тачстоун и др. [138] определяли содержание эстриола в моче беременных женщин методом прямой денситометрии продукта его реакции с красителем прочный фиолетовый, соль В; эта реакция проводилась после разделения на слоях силикагеля [119]. Те же авторы [139] применяли ТСХ на силикагеле, пропитанном 10 %-ным раствором фосфомолибденовой

кислоты, для разделения эстрогенов элюированием смесью этанол—бензол (1:1) с добавкой 5 % фосфомолибденовой кислоты или бензолом с 15 % этанола. После разделения пятна обнаруживали, прокаливая пластинки 20 мин при 110°C, и измеряли коэффициент пропускания при 560 нм. При содержании эстрогенов от 0,05 до 1 мкг наблюдалась линейная зависимость. Для денситометрического определения применяли также азобензол-4-сульфонаты [116] и дансилпроизводные [117]. Дансилпроизводные пригодны и для количественного определения посредством измерения интенсивности флуоресценции.

Двир и Чейен [118] использовали этот метод для определения содержания эстриола в моче беременных женщин.

Пензес и Эртель [140] разделяли на силикагеле производные эстрогена, эстриола и эстрадиола, элюируя их смесью хлороформ—бензол—этанол (18:2:1). После сушки хроматограммы опрыскивали смесью изопропанол—триэтиламин (4:1), снова сушили сначала на воздухе, а в заключение 24 ч над силикагелем. При этой обработке порог чувствительности снижался примерно до 1 нг, а область линейной зависимости находилась в пределах от 1 до 25 нг. Хроматографирование вели также на слоях полиамида, элюируя пробы смесью ацетон—метанол—вода (2:8:2), однако обработка таких слоев триэтиламином приводила к снижению интенсивности флуоресценции. Слои силикагеля предварительно элюировали смесью хлороформ—этанол (3:1), а слои полиамида—смесью метилэнолхлорид—тетрахлорид углерода—метанол (1:1:1) с последующей активацией при 110°C.

Джекобсон [141, 142] определял содержание эстрогенов фотограмметрическим методом.

### 3. C<sub>19</sub>-СТЕРОИДЫ

#### Качественное разделение

Андрогенные гормоны, относящиеся к C<sub>19</sub>-стероидам, представляют собой производные углеводорода этиоаллохолана (андростана). Дайер и др. [143] исследовали разделение 28 таких стероидов на слоях силикагеля G. Они использовали три различных растворителя: смесь эфир—хлороформ (1:9) для неполярных дикетонов и эфиров кетоспиртов, смесь бензол—этилацетат (1:1) для кетоспиртов и смесь бензол—этилацетат (1:4) для более полярных диолов и кетодиолов. Пятна соединений обнаруживали опрыскиванием раствором концентрированной серной кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 90°C. Старка и др. [144, 145] использовали незакрепленные слои оксида алюминия с активностью II и III. Эти авторы ис-

следовали соотношению между активностью адсорбента и составом элюирующей смеси бензол—этанол и нашли, что изменения величин  $R_f$ , вызванные различиями в активности адсорбента, можно компенсировать изменением состава элюирующего растворителя. Для семи стероидов приведены величины  $R_f$  в шести различных растворителях. Наилучшее разрешение стероидов мочи достигалось при элюировании чистым метилхлоридом или метилхлоридом с добавкой 7 % этилацетата. Разделение еще более улучшалось при многократном элюировании.

В то же время Чейндж [146] использовал распределительную хроматографию с тремя растворителями: 2,5 %-ным раствором дихлорметана в метилциклогексане и смесями бензол—метилциклогексан (1:1) и бензол—метилциклогексан—хлороформ (1:1:1), причем все эти растворители предварительно насыщали этиленгликолем. Величины  $R_f$  соединений с гидроксильными группами в положениях C-17, C-11 и C-3 возрастали в следующем порядке: C-3 < C-11 < C-17. Для соединений, полученных введением кетонной или гидроксильной группы в молекулу андростандиона, полярность возрастала в такой последовательности: 16-кето < 11-кето < 18-окси < 11β-окси < 6-кето < 6β-окси < 19-окси. Полярность увеличивалась также в результате отрыва ангулярной метильной группы при C-10. Для разделения полярных стероидов наиболее эффективным оказался трехкомпонентный растворитель. Сонанини и Анкер [147] анализировали смесь 17 соединений на слоях пропитанного пропиленгликолем кизельгура, элюируя пробу смесью циклогексан—толуол (4:1). На слоях кизельгура, пропитанных 10 %-ным раствором парафинового масла в легком петролейном эфире, разделяли также смесь эфиров, используя в качестве элюирующих растворителей 30, 50 и 70 %-ную уксусную кислоту.

Джеймс и др. [148] применили хроматографирование с обращенными фазами для разделения эфиров андрогенов. Они пропитывали силикагель 5 %-ным раствором парафина и элюировали пробы смесями вода—ацетон с соотношением компонентов 1:1; 11:9, 3:2; 7:3 и 4:1. Были рассчитаны величины  $R_M$  и коэффициенты распределения формиатов, ацетатов, пропионатов, бутиратов и валератов андростанолон, нандролон и тестостерон. Федтке и Гаевска [149] разделили смесь 5 стероидов C<sub>19</sub> методом распределительной хроматографии на целите № 545 (Johns Manville). Они использовали формамид как пропитывающий реагент, а насыщенную формамидом смесь *n*-гексан—бензол (1:1) как элюирующий растворитель. Уотсон и Бартозик [150] привели примеры применения 8 хроматографических систем типа предложенных Бушем для разделения стероидов на адсорбенте SilicAR-7 GF (Mallinckrodt).

Лисбоа [151] исследовал разделение 29 стероидов в 10 различных растворяющих системах (табл. 29.5). В дополнение к величинам  $R_f$ , указанным в таблице, рассчитаны величины  $R_{st}$  (относительно тестостерона), стандартные отклонения и величины  $R_M$ . Основываясь на результатах разделения, можно сделать ряд обобщений. В частности, следует указать, что изомеры конфигурации  $5\alpha$  (андростан) и  $5\beta$ , если у них нет заместителей в кольце А, чрезвычайно трудно разделить, если вообще возможно. То же самое можно сказать о стероидах с одной кетонной группой в кольце А, например  $5\alpha$ - и  $5\beta$ -дигидротестостеронах. Введение ненасыщенной связи приводит к небольшому изменению величин  $R_f$ , но только в некоторых случаях. В то же время введение сопряженной двойной связи приводит к изменению подвижности, так что тестостерон можно легко отделить от  $5\alpha$ - или  $5\beta$ -дигидротестостерона. Трудно разделить два аксиальных или экваториальных изомера, но соединение с экваториальной конфигурацией можно легко отделить от соединения с аксиальной конфигурацией.

Для обнаружения соединений применяют ряд специальных реакций. Так, например, пластинки опрыскивают 1 %-ным раствором анисового альдегида в 2 %-ном растворе концентрированной серной кислоты в ледяной уксусной кислоте, после чего 12—15 мин нагревают пластинки при 95—100°C. Для обнаружения 17- и 3-оксостероидов применяют реакцию Циммермана: опрыскивают хроматографическую пластинку свежеприготовленной смесью 2 %-ного этанольного раствора м-динитробензола и 1,25 н. этанольного раствора гидроксида калия (1:1). Синие пятна 3-оксостероидов появляются сразу при нагревании в токе горячего воздуха, а 17-оксостероиды (если заместитель в положении 16 отсутствует) дают фиолетовую окраску через 3—6 мин. Для идентификации этиохоланона-11 и андростанона-11 используют реактив Драгендорфа. Этот реактив окрашивает пятна  $\Delta^4$ -3-оксостероидов в оранжевый цвет, но его надо заново готовить каждые два дня и хранить при низкой температуре (4°C). Стероидные спирты можно обнаружить, опрыскивая пластинки 0,25 %-ным раствором ангидрида хромовой кислоты в ледяной уксусной кислоте и затем нагревая их 15 мин при 90—95°C. Образовавшийся при этом оксостероид обнаруживают с помощью реакции Циммермана. Семнадцать ацетатов стероидов анализировали методом ТСХ, элюируя пробу смесью этилацетат—циклогексан (1:1), однако в этой системе результаты разделения были менее удовлетворительны, чем при хроматографировании на бумаге.

Кон и Пенкейк [152] разделили 6 соединений на силикагеле G смесью циклогексан—этилацетат (1:1). Ахрем и Кузнецова [153] анализировали группу из 10 стероидов  $C_{19}$  на слоях си-

ликагеля, элюируя пробу также смесью циклогексан—этилацетат. В табл. 29.6 приведен ряд дополнительных величин  $R_f$  стероидов  $C_{19}$ , полученных Хара и Такеучи [154] на слоях силикагеля, закрепленных алебастром, а также Смитом и Феллем [114] на слоях силикагеля, закрепленных крахмалом. Неер и Ветшттейн [155] определили для адреностерона величины  $R_f$  на силикагеле с 10 различными растворителями и на оксиде алюминия с 3 растворителями. Менцель и Эртель [156] разделили на оксиде алюминия ацетаты адростендиола, адростен-триола и эстрогена, элюируя их смесью циклогексан—бутил-ацетат—бутанол (10:9:1). Применив в качестве адсорбента силикат магния без связующего, а в качестве элюирующих растворителей ряд систем, Шварц [157] определил величины  $R_f$  51 стероида и в том числе девяти соединений  $C_{19}$ . Денгес и Стайб [158] очищали образцы на пластинках со слоями силикагеля, а затем снимали их ИК-спектры. Рейзерт и Шумахер [159] разделяли  $C_{19}$ -стероиды мочи на пластинках размером 200×550 мм на слоях силикагеля. Пластинки элюировали в нисходящем направлении, располагая их под углом 10° к горизонтали, потому что под углами больше 10° возможно неравномерное продвижение элюирующего растворителя. Элюирующим растворителем служила смесь хлороформ—этанол (100:1,5). Чемберлен и др. [160] с помощью метода ТСХ подтвердили наличие в моче беременных обезьян андростандионов и андростантрионов.

Черны и др. [161], а также Германек и др. [162] разделяли эти соединения на незакрепленных слоях оксида алюминия.

Гоуэр [163] хроматографировал 16-дегидростероиды  $C_{19}$  и их ацетаты на силикагеле G с 12 различными растворителями; причем соединения, которые трудно разделить однократным элюированием, он элюировал несколько раз одним и тем же растворителем. В числе обнаруживающих реактивов были использованы 5 %-ный раствор (масса/объем) нитрата уранила в 10 %-ной (объем/объем) серной кислоте. Под действием этого реактива большинство исследованных соединений дает специфическую окраску, появляющуюся после нагревания при 110°C.

Райт [164] использовал повторное элюирование смесью циклогексан—циклогексанон (9:1 или 4:1) для разделения близких по строению пар стероидов, например  $3\beta$ -окси- $5\alpha$ - и  $3\alpha$ -окси- $5\beta$ -андростанона-17. Адсорбентом служили закрепленный крахмалом силикагель. Реммерс и др. [165] разделяли тестостерон и эпитестостерон многократным (5×) элюированием на силикагеле смесью дихлорметан—этилацетат (9:1) или непрерывным 8-часовым элюированием тем же растворителем при 4°C. Хорошее разделение удалось получить также при двукратном элюировании; причем в первом направлении пробу

Величины  $R_f \times 100$  некоторых стероидов  $C_{19}$ , полученные на силикагеле G с 10 растворителями при длине пути элюирования 15 см, и окраска их пятен после обработки смесью анисового альдегида с серной кислотой [151]

Сteroid	Растворители <sup>a</sup>										Окраска
	A	B	B	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	
	5 $\alpha$ -Андростанон-11	69			87		72	72		66	
5 $\beta$ -Андростанон-11	69					73	71		66	64	"
5 $\alpha$ -Андростанон-17	73	78			75	78	76	80	66	55	Синяя
5 $\alpha$ -Андростандион-3,17	46	74		77	66	63	69	72	53	17	Оливковая
5 $\beta$ -Андростандион-3,17	64	74		78	67	60	67	69	49	14	Коричневая
5 $\alpha$ -Андростендион-3,17	61	76		75	66	58	67	67	45	13	Фиолетово-синяя
4-Андростендион-3,17										8	Оранжево-розовая
5 $\alpha$ -Андростен-2-дион-7,17	67	52	77	81	70	61	70	74	55	27	Оливковая
5 $\beta$ -Андростантрион-3,11,17	52	25	69	70	66	50	58	56	36	4	Красно-коричневая
5 $\alpha$ -Андростанол-17	64	54	64	78	62	57	57	73	46	31	Синяя
17 $\beta$ -Окси-5 $\alpha$ -андростанон-3	57	35	61	74	57	42	49	62	31		От коричнево-оливковой до черновато-оливковой
17 $\beta$ -Окси-5 $\beta$ -андростанон-3	55	30	61	73	59	42	46	63	28		Ярко-фиолетовая
17 $\beta$ -Оксандростен-4-он-3	48	23	58	66	56	49	43	52	24	4	От красно-оранжевой до фиолетово-пурпурной
3 $\alpha$ -Окси-5 $\alpha$ -андростанон-17	55	33	63	74	58	43	50	62	29		Зеленая
3 $\beta$ -Окси-5 $\alpha$ -андростанон-17	52	30	58	72	55	39	44	61	27		"
3 $\alpha$ -Окси-5 $\beta$ -андростанон-17	49	24	58	71	56	38	43	57	23		"
3 $\beta$ -Окси-5 $\beta$ -андростанон-17	57	36	62	73	59	44	50	66	33		"
11 $\beta$ -Окси-5 $\alpha$ -андростандион-3,17	57	27	63	75	64	44	46	59	27		Коричневая
17 $\beta$ -Окси-5 $\alpha$ -андростандион-3,17	40	12	56	57	49	29	36	42	18		"
3 $\alpha$ -Окси-5 $\beta$ -андростандион-1,17	38	9	52	61	55	33	31	43	18		Коричнево-оливковая
3 $\alpha$ -Окси-5 $\alpha$ -андростандион-7,17	40	12	53	54	47	27	32	40	16		Зелено-оливковая
3 $\beta$ -Окси-5 $\alpha$ -андростандион-7,17	33	6	50	49	45	23	27	34	13		"
5 $\alpha$ -Андростандиол-3 $\alpha$ ,17 $\beta$	50	25	50	70	48	32	32	56	18		Синяя
5 $\alpha$ -Андростандиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$	48	25	47	68	49	25	29	54	16		"
Андростен-4-диол-3 $\beta$ ,17 $\beta$	50	25	47	70	50	30	32	58	17		Темно-синяя
5 $\beta$ -Андростандиол-3 $\alpha$ ,17 $\beta$	44	17	40	65	48	23	23	50	13		Синяя
3 $\beta$ ,11 $\beta$ -Диокси-5 $\alpha$ -андростанон-17	44	14	43	68	51	28	22	51	13		Зеленая
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Диокси-5 $\beta$ -андростанон-17	43	12	44	66	52	29	23	48	13		Темная серо-синяя

<sup>a</sup> Растворители: А — этилацетат—циклогексан—этанол (9:9:2); Б — этилацетат—циклогексан (1:1); В — хлороформ—этанол (9:1); Г — этилацетат—*n*-гексан (насыщенный водой)—этанол—уксусная кислота (72:13,5:4,5:10); Д — бензол—этанол (4:1); Е — бензол—этанол (9:1); Ж — хлороформ—этанол (9:1); З — бензол—этанол (19:1); И — этилацетат—*n*-гексан—уксусная кислота (15:4:1); К — *n*-гексан—этилацетат (3:1).

Величины  $R_f \times 100$  стероидов  $C_{19}$ , полученные на силикагеле с различными растворителями в камере с насыщенной атмосферой

Стероид	Силикагель с 5 % сульфата кальция [154]					Силикагель с 5 % крахмала [114]		
	бензол — ацетон (4 : 1)	бензол — метанол (9 : 1)	эфир	хлороформ — ацетон (3 : 1)	хлороформ — метанол (97 : 3)	гексан — этилацетат (4 : 1)	гексан — этилацетат (1 : 1)	этил-ацетат
5 $\alpha$ -Андростанол-3 $\alpha$ -он-17	46	32	64	46	77	4	32	63
5 $\alpha$ -Андростанол-3 $\beta$ -он-17	38	29	55	41	67	3	32	63
5 $\alpha$ -Андростанол-17 $\beta$ -он-3								
5 $\alpha$ -Андростан-17 $\alpha$ -метилол-17 $\beta$ -он-3	37	14	65	38	37			
5 $\beta$ -Андростандиол-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -он-17	28	20	33	36	50			
5 $\alpha$ -Андростанол-3 $\alpha$ -дион-11,17	25	16	20	30	41			
5 $\beta$ -Андростанол-3 $\alpha$ -дион-11,17	20	21	29	25	50			
5 $\beta$ -Андростанол-12 $\alpha$ -дион-3,17							42	72
5 $\alpha$ -Андростандион-3,17	30	20	14	48	75			
5 $\beta$ -Андростантрион-3,12,7	35	23	49	41	63	1	15	47
$\Delta^4$ -Андростенол-17 $\beta$ -он-3	41	27	49	48	73	1	17	48
$\Delta^4$ -Андростен-17 $\alpha$ -метилол-17 $\beta$ -он-3						3	28	70
$\Delta^4$ -Андростен-17 $\alpha$ -этилол-17 $\beta$ -он-3	58	53	56	55	80	2	20	55
$\Delta^4$ -Андростендион-3,17						0	32	69
5 $\alpha$ -1-Андростендион-3,17							14	44
1,4-Андростандион-3,17								
$\Delta^4$ -Андростендион-3,11,17	36	40	27	52	82			
3 $\beta$ -Ацетокси 5 $\alpha$ -андростан	77	74	87	66	97			

элюировали растворителем этого состава, а во втором — смесью хлороформ—циклогексан—уксусная кислота (5 : 4 : 1).

Лисбоа [166—169] разделил большую группу андростановых стероидов. Лисбоа и Гофман [170] использовали непрерывное элюирование для разделения эпимерных  $C_{19}O_2$ -стероидов. Они хроматографировали 21 стероид в следующих 4 смесях: циклогексан—этилацетат (1 : 1 и 4 : 1), *n*-гексан—этилацетат (3 : 1) и бензол—этилацетат (3 : 1) Адсорбентом служил силикагель 60F (Merck).

В работах [171—175] описано разделение 17-кетостероидов в виде производных 2,4-динитрофенилгидразонов. Старнес и др. [172] использовали для разделения этих производных слой оксида алюминия и смесь бензол—гексан—этилацетат (3 : 1 : 1). Для дальнейшей очистки они проводили повторное хроматографирование смесью толуол—этилацетат (3 : 1). Пензес и др. [173] получили величины  $R_f$  12 производных; разделение они вели на полиамиде с 8 системами элюирующих растворителей, в том числе смесями метилхлорид—метанол (2 : 8), ацетон—этанол—вода (5 : 16 : 4) и ацетон—метанол—уксусная кислота (20 : 80 : 0,5). Хакль [174] разделил на силикагеле 7 производных, элюируя пробы смесями хлороформ—ацетон (98 : 2, 96 : 4, 94 : 6 и 92 : 8) и диэтиловый эфир—петролейный эфир (7 : 3). Все семь производных были одновременно разделены при двумерном хроматографировании, когда элюирование в одном направлении проводили дважды смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир (7 : 3), а в другом направлении — смесью хлороформ—ацетон (94 : 6). Последние растворители использовали также для разделения многократным элюированием производных тринадцати 17-кетостероидов [175].

Тонкослойную хроматографию применяли также [176—178] для разделения изомерных О-метилоксимов некоторых кетостероидов.

Церри и Маффи [179] разделили на силикагеле G группу из пяти производных тестостерона, элюируя пробу смесью циклогексан—этилацетат (17 : 3).

В моче обычно содержатся конъюгаты стероидов—глюкозидуронаты или сульфаты; их можно сначала гидролизовать и затем разделить соответствующие стероиды или хроматографировать непосредственно в исходном состоянии. Крепи и др. [180] хроматографировали смесь сульфатов стероидов  $C_{19}$  методом двумерной хроматографии на пластинках, покрытых смесью кизельгура G и силикагеля G (19 : 1 и 9 : 1). После нанесения пробы пластинки элюировали 2 ч смесью бутилацетат—толуол—4 н. раствор гидроксида аммония—метанол (85 : 35 : 50 : 70). Сразу после окончания элюирования пластинки поворачивали на 90° и элюировали во втором направлении растворителем,

состоящим из тех же компонентов, но в соотношении 11 : 9 : 12 : 16. Элюирование во втором направлении проводили на расстоянии 15 см. Сульфаты обнаруживали, опрыскивая хроматограммы реагентом на основе метиленового синего. Эртель и др. [181] также хроматографировали группу конъюгатов стероидов C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub> и C<sub>21</sub> на слоях DEAE- и ECTEOLA-целлюлозы. Они применяли семь различных растворителей и получили лучшее разделение, чем на слоях силикагеля. Сегура и др. [182] разделили несколько стероидных глюкуронидов на слоях полиамида, элюируя пробу смесью этилформиат—метанол—вода—муравьиная кислота (10:4:5:1) и метанол—вода—муравьиная кислота (12:7:1). На полиамиде Woelm после опрыскивания хроматограмм 4 %-ным раствором хлорида алюминия в смеси метанол—вода (3:1) глюкурониды ярко флуоресцировали в УФ-свете.

### Количественное определение

Паникуцци и др. [183] использовали для количественного определения C<sub>19</sub>-стероидов реакцию Циммермана (см. выше в разд. «C<sub>18</sub>-стероиды»). Вермейлен и Верпланке [184] этим же способом определяли содержание тестостерона; в этом случае получали две хроматограммы продуктов промежуточной стадии окисления и только потом оценивали содержание разделенных веществ в пятнах. В работе этих авторов указано содержание тестостерона в пробах, взятых у здоровых и больных пациентов обоего пола.

Кавина и др. [185] использовали тетразолиевый синий реактив (Т-255) для колориметрического определения содержания альдостерона. Общий вид составлял 70,7 %.

Для количественного определения стероидов использовали также андрогены с радиоактивной меткой. Шульце и Венцель [186] сконструировали специальный проточный газовый счетчик с плоской диафрагмой, предназначенный для измерения радиоактивности тонкослойных пластинок. Они продемонстрировали эффективность этого счетчика на стероидах, меченных <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C. Риондель и др. [187] определяли содержание тестостерона в крови человека сцинтилляционным методом с применением сразу двух изотопов. При этом 1,2-<sup>3</sup>H-тестостерон выполнял роль индикатора, а <sup>35</sup>S-тиосемикарбазид — реактива. Чтобы удалить из тиосемикарбазона все примеси, его хроматографировали на тонком слое и на бумаге. Фактическое измерение проводили с диацетилпроизводным тиосемикарбазона. Спарагана [188] определял тестостерон в плазме крови методом изотопного разбавления с двойной меткой. Обработывая пробу меченным тритием уксусным ангидридом, он получал

ацетат и затем проводил двумерное хроматографирование на тонком слое силикагеля, элюируя в первом направлении пробу смесями бензол—ацетон (3:1) и гексан—этилацетат (1:1), а во втором направлении — смесями бензол—этилацетат (3:1) и дихлорметан—метанол (10:1). Бардин и Липсетт [189] определяли содержание тестостерона и андростендиона сцинтилляционным методом, восстанавливали андростендион до тестостерона, ацетилювали и переводили полученный ацетат в О-метоксим, обрабатывая при 26°C раствором хлорида метоксидаммония в пиридине.

Ряд авторов [190—195] после предварительного разделения биологических проб на тонком слое определяли содержание тестостерона методом газовой хроматографии [190—195]. Герра-Гарсия и др. [190] нашли, что чувствительность предложенного ими метода составляет 0,1 мкг. Средний выход, установленный сцинтилляционным методом, равен 39 %. Луизи и др. [191] гидролизуют пробы мочи, проводят два отдельных хроматографирования на тонком слое с тем, чтобы очистить продукт, затем отделяли на тонкослойной пластинке ацетат тестостерона и определяли его содержание методом газовой хроматографии. Эксли [192] достиг высокой степени чувствительности, используя электронно-захватный детектор для определения дигептафторбутирата тестостерона. Тестостерон очищали методом ТСХ и затем переводили в указанное производное. Эту методику можно применять для определения наной субнаногаммовых количеств тестостерона. Она проще и быстрее, а также несколько более чувствительна, чем методика изотопного разбавления с двойной меткой. Фабр и др. [195] использовали методику электронно-захватного детектирования для определения содержания альдостерона и тетрагидроальдостерона в крови. Оба соединения переводили в лактоны, окисляя их иодной кислотой, при этом кортизон и родственные ему стероиды одновременно превращались в этиановые кислоты. Последние легко отделить, промывая пробу раствором бикарбоната натрия до хроматографирования. Пределы чувствительности анализа на альдостерон составляют 10—20 нг. γ-Лактон тетрагидроальдостерона в виде монохлордифторпроизводного можно определить при содержании его в пробе вплоть до пикограммовых количеств.

Для количественного определения кетостероиды переводили в производные 2,4-динитрофенилгидразона. Кент и Равич [196] элюировали эти производные и измеряли оптическую плотность элюатов при 390 нм. Кнапштейн и др. [197, 198] использовали для количественного определения этих производных денситометрию *in situ*.



Струк и др. [199] проводили непосредственные измерения отражательной способности при определении содержания тестостерона и андростен-4-диона-3,17 в пробах, разделенных методом ТСХ. Коэффициент вариации составлял 10 % при содержании каждого соединения 0,2—0,5 мкг. Хук [200] выделял тестостерон на силикагеле и затем переводил его в триметилсилильное производное, которое хроматографировал на слоях оксида алюминия; содержание этого производного он определял, непосредственно измеряя интенсивность флуоресценции. Этот метод чувствителен при содержании тестостерона порядка  $10^{-7}$  %.

Греф [201] измерял интенсивность флуоресценции элюатов дансилпроизводных оккостероидов при 511 нм после разделения их на слоях силикагеля. Чувствительность метода до 0,02 мкг.

#### 4. $C_{21}$ -СТЕРОИДЫ

##### Качественное разделение

Основу скелетной структуры соединений этой группы составляет углеводород прегнан. В ряде работ описано разделение этих соединений на самых различных адсорбентах с различными элюирующими системами. Шварц [202] разделил смесь 8 таких соединений на оксиде алюминия, предварительно дезактивированном часовым встряхиванием с 2,5 %-ной уксусной кислотой. В качестве растворителей для разделения он использовал петролейный эфир, бензол, смеси петролейного эфира с бензолом и бензола с этанолом. Шварц [157] применял также в качестве адсорбента силикат магния без связующего; так как у этого адсорбента щелочная реакция, его нейтрализуют, добавляя 1,5 мл уксусной кислоты на 100 г адсорбента, и получают густую суспензию с рН 6,5. В качестве элюирующих систем были испытаны 8 различных растворителей, начиная с бензола и хлороформа и кончая их смесями с более полярными растворителями — этанолом, уксусной кислотой и диоксаном. В результате оказалось, что стероидные соединения, имеющие один и тот же полярный заместитель, но отличающиеся другими, менее полярными заместителями, характеризуются очень близкими величинами  $R_f$ . Для обнаружения пятен хроматограммы опрыскивали концентрированной серной кислотой и затем нагревали при 110—130°C, после чего эти пятна можно было наблюдать как в видимом, так и в УФ-свете.

Шварц и Сихора [203] разделяли кортикоиды на кислом оксиде алюминия с другими растворителями, в том числе со смесью бензол—диоксан—диметилформамид—этанол. Хотя кортизон и преднизон нельзя разделить на кислом оксиде алюми-

ния ни с одним из перечисленных растворителей, их можно было удовлетворительно разделить на щелочном оксиде алюминия с активностью I или II, элюируя диэтиловым эфиром или его смесью с петролейным эфиром. При элюировании этими растворителями кортизон остается на стартовой линии, а величины  $R_f$  преднизона меняются от 0,14 до 0,79 в зависимости от состава растворителя.

Хара и Такеучи [154] использовали тонкие слои силикагеля в сочетании со смесями бензола или хлороформа с ацетоном и метанолом, а также с этиловым эфиром. Они дали перечень цветных реакций, полученных с концентрированной серной кислотой, смесями концентрированной серной кислоты с уксусным ангидридом, хлорсульфоновой и уксусной кислот, а также с раствором трихлорида сурьмы и хлороформе. Смит и Фёлль [114] анализировали стероиды этой группы на слоях силикагеля, связанных рисовым крахмалом, и нашли, что крахмал более удобен в качестве связующего, чем гипс, так как слои с гипсом довольно хрупкие. Для разделения веществ, чувствительных к кислотам, слой силикагеля с крахмалом предварительно нейтрализовали до рН 6,4. Эти авторы испытали ряд обнаруживающих реагентов и не наблюдали нежелательного влияния крахмала. В частности, хорошие результаты дал 10 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле, оказавшийся более чувствительным, чем соответствующий реагент, применяемый в хроматографии на бумаге. После опрыскивания пластинок и 10-минутного нагревания при 100°C стероиды обнаруживаются в виде синих пятен на лимонно-желтом фоне. Чувствительность при опрыскивании указанным реагентом составляла 0,125 мкг на кислых и 0,25 мкг на нейтральных слоях. На слоях, связанных крахмалом, этот реагент отличался большей чувствительностью, чем на слоях, связанных гипсом. При обнаружении на нейтральных слоях к каждому 100 мл реагента с 10 %-ным содержанием фосфомолибденовой кислоты добавляют для повышения чувствительности 4 мл концентрированной соляной кислоты. Величины  $R_f$  ряда стероидов  $C_{21}$ , полученные с различными элюирующими растворителями, даны в табл. 29.7.

Кавина и Викари [204], а также Вальди [205] использовали слои силикагеля G в сочетании с различными элюирующими растворителями; найденные этими авторами величины  $R_f$  сведены в табл. 29.8. Лисбоа [206] хроматографировал на силикагеле в восьми растворителях тридцать один  $\Delta^5$ -3-оккостероид  $C_{21}$ . Для улучшения разрешения некоторых соединений применялись слои адсорбента, пропитанные раствором борной кислоты. Обработка пятен проб на силикагеле раствором гидразина изоникотиновой кислоты в разбавленной уксусной кислоте позволила отделить прегненолон в виде гидразона от

Величины  $R_f \times 100$  стероидов  $C_{21}$ , полученные в различных хроматографических системах<sup>а</sup>

Стероид	Силикагель [154]							Оксид алюминия <sup>б</sup> [203]							Силикагель <sup>в</sup> [114]							Силикат магния <sup>г</sup> [157]						
	А	Б	В	Г	Д	Е		Ж	З	И	К	Л	М	Н	О	П	Р	С	Т	И	У	К	Е	Ф				
	67	70	89	63	97			63	75	49	70	40	48	15	51		20	32	52	30	45	49	76	93				
Прегнадиол																	20	35	52	30	45	49	76	93				
5 $\alpha$ -Прегнадиол-3,20	30	18	55	38	48											25	53	52	30	28	35	49	76	93				
5 $\alpha$ -Прегнадиол-3 $\beta$ ,20 $\alpha$	32	18	59	38	48									5	36	37	58	52	30	32	35	49	76	93				
5 $\alpha$ -Прегнадиол-3 $\beta$ ,20 $\beta$																												
4-Прегнедиол-17 $\alpha$ ,21-диол-3,20	22	13	29	30	31	49	63	75	49	70	40	48	15	51		20	35	52	30	28	35	49	76	93				
17 $\alpha$ -Оксипротестерон																												
Прогестерон	65	57	66	60	97											37	58	52	30	20	28	35	49	76	93			
4-Прегенол-21-диол-3,20	38	37	37	44	81	70	37	62	72	60	62		22	56	96	21	43	52	30	31	40	49	76	93				
Преднизолон						26	30	50	29	13	29		6	38	69	12	30	43	30	4	16	21	24	25				
Преднизолон						30	30	50	29	13	29		5	35	46	11	20	43	30	4	16	21	24	25				
Дексаметазон						37	37	48	33	33	33		6	35	46	13	39	43	30	9	13	13	24	25				
Триаминиолон						20	16	6	6	6	6		7	38	75	5	20	43	30	10	17	17	35	52				
Кортизон	14	11	13	18	17	32	44	67	57	18	18	25	7	38	75	17	31	43	30	16	24	34	31					
Гидрокортизон	9	10	13	9	8	25	42	53	14	35	18	25	6	38	55	14	33	43	30	11	16	16	41	51				
Кортикостерон	15	12	14	19	25	12	21	38					2	20	33	6	20	43	30	4	7	7	19	15				
11-Эпикортизол						35	46		30				3	13	36	13	36	43	30	7	13	13	32	45				
6 $\alpha$ -Метилпреднизолон						57			51	41	63		6	38		16	44	43	30	16	24	24	44	48				
5 $\alpha$ -Прегнадиол-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -он-20																												
Прегненолон																												
5,16-Прегнадиол-3 $\beta$ -он-20																												
3 $\beta$ -Ацетоксипрегнадиен-5,16-он-20																												
5 $\alpha$ -Прегнен-16-ол-3 $\beta$ -он-20																												
5-Прегнедиол-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -он-20																												
5-Прегнедиол-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-он-20																												
5-Прегнедиол-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-он-20																												
12 $\alpha$ -Ацетокси-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -диокси-5 $\beta$ -прегнадиен-он-20																												
Ацетат 4-прегненол-21-диола-3,20																												
Ацетат гидрокортизона																												
21-Ацетат 11-эпикортизола																												
11,21-Диацетат 11-эпикортизола																												
21-Ацетат 4-прегнендиол-17 $\alpha$ ,21-диола-3,20																												
17,21-Диацетат 4-прегнендиол-17 $\alpha$ ,21-диола-3,20																												
Капроат 17 $\alpha$ -оксипротестерона																												
21-Ацетат 4-прегнендиол-17 $\alpha$ ,21-триона-3,11,20																												
Ацетат преднизолона																												
	4	12	4	7	13	90				79	84		9	44		25	46	46	35				54	83				
						67				50	73																	
						51				38	62																	
						78	81		76	58	76																	
						75	81		73	58	80																	
						85																						
						68			62	53	70																	
						64			63	49	67																	

<sup>а</sup> Растворители: А — бензол—ацетон (4:1); Б — бензол—метанол (9:1); В — эфир; Г — хлороформ—ацетон (3:1); Д — хлороформ—метанол (97:3); Е — бензол—диоксан (2:1); Ж — бензол—диоксан (1:1); З — бензол—диметилформамид (9:1); И — хлороформ—этанол (99:1); К — хлороформ—этанол (96:4); Л — бензол—этанол (95:5); М — диэтилопириловый эфир; Н — гексан—этилацетат (4:1); О — гексан—этилацетат (1:1); П — этилацетат; Р — бензол—пропанол-2 (4:1); С — бензол—этанол (98:2); Т — бензол—этанол (99:1); У — хлороформ—этанол (98:2); Ф — эфир—этанол (98:2).

<sup>б</sup> Деактивирован встряхиванием в течение 1 ч с 2,5 %-ной уксусной кислотой.

<sup>в</sup> Силикагель с добавкой 5 % связующего—рисового крахмала.

<sup>г</sup> Незакрепленные слои.

Величины  $R_1 \times 100$  (отнесенные к кортизону) стероидов  $C_{21}$ , полученные на силикагеле G с различными растворителями в камере с насыщенной атмосферой

Стероид	Хлороформ — этанол <sup>a</sup> (9 : 1)	Хлороформ — 90%-ный метанол <sup>a</sup> (9 : 1)	Циклогексан — этилацетат <sup>a</sup> (1 : 1)	Хлороформ — ацетон <sup>b</sup> (9 : 1)	Хлороформ — ацетон <sup>b</sup> (4 : 1)	Циклогексан — хлороформ — уксусная кислота <sup>b</sup> (7 : 2 : 1)	Метиленхлорид — ацетон <sup>b</sup> (4 : 1)	Хлороформ — уксусная кислота <sup>b</sup> (9 : 1)	Метиленхлорид — уксусная кислота <sup>b</sup> (9 : 1)
3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-Триокспрегнандион-11,20	53	38	59	470	300	235	206	<400	<533
3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-Тетраокспрегнанон-20	33	22	55						
4-Прегнендиол-17 $\alpha$ ,21-дион-3,20	116	131	230						
17 $\alpha$ -Оксипрогестерон	145	152		80	85	78	58		
4-Прегненол-21-трион-3,11,20	125	160	100						
4-Прегненол-21-дион-3,20	140	200	300						
3 $\beta$ ,11,21-Триоксисаллопрегнанон-20	73	75	100						
3 $\alpha$ ,21-Диоксипрегнандион-11,20	79	91	40						
11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-Триокспрегнандион-3,20	70	68	130						
17 $\alpha$ ,21-Диоксипрегнантрион-3,11,20	108	92	140						
17 $\alpha$ ,21-Диоксипрегнандион-3,20	115	128	360						
3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-Триокспрегнанон-20	80	59	170						
Преднизон	94	82	80	80	85	78	58	80	80
Преднизолон	62	45	75		20	22	45	40	53
Дексаметазон	72	51	140	60	55	35	52	50	67
Триамцинолон	0	23	10						
Кортизон	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Гидрокортизон	66	50	75	30	30	35	74	40	73
Кортикостерон	102	119	100						
Альдостерон	85	85	35		30	109	37	100	146
Прегненолон				520	290	287	213	<400	<533
4-Прегенол-3 $\alpha$ -он-20				490	300	283	216	<400	<533
Прегнандион-3,20-ол-21				530	295	270	219	<400	<533
Аллопрегнандиол-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$				390	220	200	200	355	<533
Прегнандиол-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$				240	170	152	197	325	500
16-Метилен-1-легидро-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -диоксипрогестерон				180	170	196	136	215	233
16-Метиленпреднизолон					15	52	55	40	73

<sup>a</sup> Данные работы [204].

<sup>b</sup> Данные работы [205].

16-дегидропрогестерона, который в условиях обработки не образовывал гидразона. Левин и др. [207] нашли, что 20 %-ный раствор ацетона в изопропиловом эфире — эффективный растворитель при хроматографировании на силикагеле. С помощью этого растворителя можно разделить кортексогон и кортикостерон.

Старка и Маликова [208], а также Черны и др. [161] использовали для разделения кортикостероидов незакрепленные слои оксида алюминия. Черны и соавторы разделили на силикагеле 6 стероидов, элюируя пробу смесью бензол—этилацетат (1:1). Для обнаружения этих веществ они использовали оксид алюминия, пропитанный морином (3,5,7,2',4'-пентаоксифлавоном), который представляет собой флуоресцентный индикатор. Кроме стероидов  $C_{21}$ , эти авторы хроматографировали стероиды  $C_{19}$  и  $C_{18}$ , а также некоторые сапонины.

Нгуен и Чемерисская изучали хроматографические свойства 3-кетостероидов на незакрепленных слоях слабощелочного [209] и кислого [210] оксида алюминия. На кислом оксиде алюминия, как правило, получаются более высокие величины  $R_f$ . Шварц [211] указал величины  $R_f$  16 $\alpha$ ,17-эпокси- $\Delta^5$ -прегненол-3 $\beta$ -она-20 и семи родственных стероидов, полученные на кислом оксиде алюминия с пятью растворителями, в том числе со смесями петролейный эфир—бензол (1:1 и 2:1) и бензол—этанол (95:5). Шрайбер и Адам [211а] нашли, что оксид алюминия нельзя использовать для хроматографирования 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -диацетокси-5 $\alpha$ -прегнанона-20, потому что этот адсорбент вызывает расщепление 16 $\beta$ -ацетоксигруппы.

Матис и др. [212] нашли, что для разделения стероидов  $C_{21}$  удобно использовать адсорбционные слои сульфата кальция: тонкоразмолотый адсорбент прилипает к пластинке-подложке даже в отсутствие связующего. Для разделения 17-оксикортикоидов они применяли в качестве элюирующего растворителя смесь ацетон—бензол (1:4). Чтобы более четко отделить 5 $\beta$ -прегнантриол-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-дион-11,20 от 5 $\beta$ -прегнантетрол-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-она-20, пробу элюировали 3 %-ным раствором этанола в хлороформе на расстоянии 25 см. Эти же авторы анализировали чистые кортикоиды на незакрепленных слоях силикагеля G, элюируя пробу под углом примерно 20° смесью метанол—хлороформ (5:95). Негер и Ветштейн [155] определили величины  $R_f$  прогестерона и 5-прегненол-3 $\beta$ -она-20 на силикагеле с 8 различными растворителями. Авторы работы [213] анализировали смесь 5 фармацевтически важных кортикостероидов на силикагеле, элюирующими растворителями служили этилацетат и смесь хлороформ—ацетон (3:1). Эти стероиды экстрагировали из таблеток эфиром. Чеше и Сначке [214] разделили несколько производных прегнана с помощью

диизопропилового эфира и его смеси с уксусной кислотой (5:2).

Федтке и Гаевска [215] использовали целит № 545 (Johns Manville), пропитанный формамидом, а также применяемые в хроматографии на бумаге растворяющие системы Заффарони. Одно из главных преимуществ этих систем — быстрая разделение: за 4—5 мин можно получить хроматограмму при длине пути элюирования 10 см. Растворителями в данном случае служили насыщенная формамидом смесь бензол—хлороформ (1:1), а также насыщенный формамидом хлороформ. Последний растворитель применяли также для разделения ацетатов стероидов. После хроматографирования пластинки сушили в шкафу при 90—100°C, чтобы удалить пропитывающее соединение и элюирующие растворители, а затем опрыскивали обнаживающим реагентом. В результате была установлена эффективность нескольких таких реагентов, в том числе концентрированной фосфорной кислоты и хлорида трифенилтетразолия. Явата и Гольд [216] анализировали смесь 11 кортикостероидов также с помощью системы Заффарони и системы Буша. Проведенные ими опыты показали, что наличие кетогруппы у атома C-11 гораздо больше способствует увеличению подвижности соответствующего соединения, чем наличие ОН-группы у атомов C-11 или C-17. Системы Буша показали несколько лучшее разрешение. Гельдель и др. [217] также применили растворители типа растворителей Буша и Заффарони, используя силикагель как основу для нанесения жидкой неподвижной фазы. Пользуясь капиллярным подъемом, они пропитывали слой силикагеля 40 %-ным раствором формамида в ацетоне. При этом хроматографирование велось различными методами. Например, пробу в одном направлении элюировали формамидом, насыщенным хлороформом, а при элюировании во втором направлении в некоторых случаях жидкую неподвижную фазу удаляли, т. е. во втором направлении разделение осуществлялось методом адсорбционной хроматографии. Эффективность разделения этим методом зависит от адсорбционной активности силикагеля; ее можно снизить, обрабатывая пластинку водяным паром после удаления жидкой неподвижной фазы, содержащей формамид. Как растворители применяли также другие смеси, состоявшие из гексана, бензола, хлороформа и бутилацетата, причем все эти растворители насыщали формамидом. Более полярные стероиды — производные альдостерона, кортизола и кортикостерона — разделяли методом непрерывной нисходящей хроматографии, элюируя пробу в течение 6 ч смесью формамид—бутилацетат—вода (1:20:1). Другая методика предусматривает многостадийное двумерное элюирование (рис. 29.2). Первое элюирование проводят бензолом, насыщенным формамидом,

в пределах 1 см от верхнего края пластинка. После этого соскабливают слой адсорбента по линии, проходящей через всю пластинку, чтобы отделить от остальных стероидов кортизон и прогестерон, которые движутся вблизи фронта растворителя. Далее элюируют пробу в том же направлении смесью бензол—

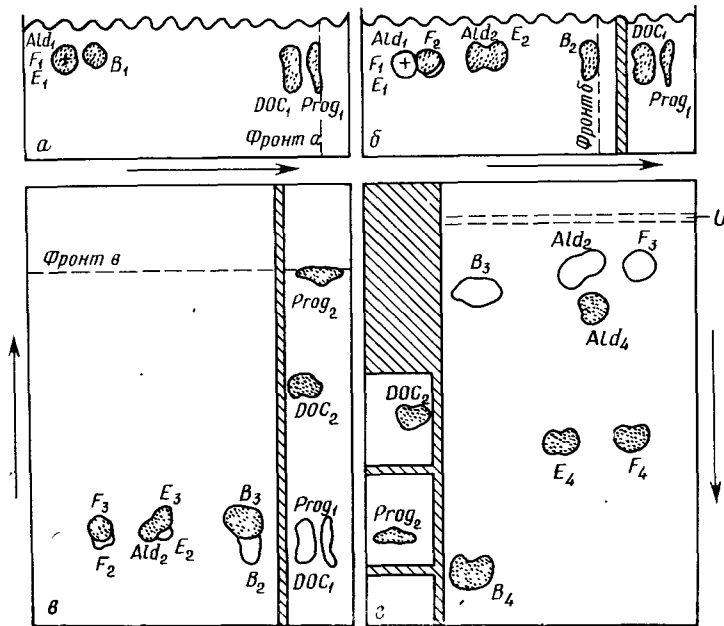


Рис. 29.2. Пример разделения смеси кортикостероидов методом двумерной ТСХ с повторным элюированием [217] (с разрешения авторов и Gruyer and Co.).

а — нисходящее хроматографирование бензолом, насыщенным формамидом; б — нисходящее хроматографирование в том же направлении насыщенной формамидом смесью бензол—хлороформ (1:7), проведенное после соскабливания заштрихованной площади; в — восходящее хроматографирование под прямым углом к предыдущему, проведенное смесью формамид—*n*-бутилацетат—вода (1:20:1); г — нисходящее хроматографирование в том же направлении и с тем же растворителем в течение 5–6 ч после соскабливания заштрихованных зон. Неподвижная фаза — силикагель, пропитанный 40 %-ным раствором формамида в ацетоне. Фронт — положение фронта растворителя после данной стадии элюирования. Анализируемые соединения Ald — альдостерон, F — кортизол, E — кортизон, B — кортикостерон, Prog — прогестерон, DOC — дезоксикортикостерон

хлороформ (1:7) (также насыщенной формамидом), пока фронт растворителя не достигнет такого положения, где он будет удален примерно на 1 см от разделяющей линии. Третье элюирование проводят под прямым углом к первому и второму элюированию, используя как элюирующий растворитель смесь формамид—*n*-бутилацетат—вода (1:20:1). Соскабливая разделительные линии, отделяют от остальной части пластинки ту часть, где находятся кортексон и прогестерон, уже четко отде-

ленные друг от друга. После этого элюируют пластинку четвертый раз в течение 5–6 ч тем же растворителем и в том же направлении, что и при третьем разделении, но посредством нисходящей хроматографии, в результате чего достигается полное разделение всех шести соединений.

Бутрук и Федтке [218] хроматографировали находящиеся в моче метаболиты гидрокортизона на слоях кизельгура, пропитанных 10 %-ным раствором этандиола в ацетоне; в качестве элюирующего растворителя они применяли смесь этандиола с дихлорметаном.

Квезенберри и Унгар [219] выделяли методом ТСХ альдостерон и гидроксидсодержащие стероиды из экстрактов надпочечников крупного рогатого скота. Корзун и Броди [220] применили ТСХ для идентификации ацетатов дезоксикортикостерона и альдостерона, а также других стероидов в продуктах, изготовленных из кунжутного масла, не проводя предварительного экстрагирования. Лаблер и Шорм [221] хроматографировали в различных растворителях на незакрепленных слоях оксида алюминия несколько оксикортизонов, замещенных в положении C-18.

Поскольку ТСХ позволяет провести разделение очень быстро, она обязательно будет широко применяться в медицинских исследованиях; число публикаций, посвященных этим вопросам, неизменно возрастает. Шейффарт и др. [222–224] изучали с помощью ТСХ поглощение и метаболизм различных производных кортизона. Бернауэр и Шмидт [225–229] исследовали содержание кортикостероидов в морских свинках при различных условиях. Паскуалини и Джейл [230] выделили и идентифицировали 5β-прегнантриол-11β,17α,21-дион-3,20 (дигидрокортизол) из мочи больных раком коры надпочечников, вызывающим феминизацию.

Аувинен и Фаворская [231] использовали ТСХ для разделения 2,4-динитрофенилгидразонов стероидных кетонов. Путем хроматографирования соответствующих производных на силикагеле смесями хлороформ—бензол (3:1) или бензол—уксусная кислота (19:1) Уотсон и Романов [232] смогли доказать, что моно- и бис-2,4-динитрофенилгидразоны прогестерона имеют по два изомера.

В работе [178] описано разделение пяти О-метоксимов прогестерона бензолом на оксиде алюминия [173].

Такеучи [233] исследовал на слоях силикагеля в 28 различных растворителях 12 прегнановых стероидов вместе с группой стероидов C<sub>18</sub> и C<sub>19</sub>.

Используя девять различных растворителей, Лисбоа [234] разделил и идентифицировал 32 Δ<sup>4</sup>-кетостероида прегнанового ряда на силикагеле G с 9 различными растворителями. Для разделе-

ния стероидов на 4 основные группы он проводил предварительное элюирование смесью хлороформ—этанол (9:1). Стероиды первой группы ( $R_f < 0,35$ ) подвергали дальнейшему разделению посредством двумерной хроматографии смесями хлороформ—этанол и этилацетат—гексан—этанол—уксусная кислота (72:13,5:4,5:10). Соединения с величинами  $R_f$  от 0,35 до 0,50, образующие вторую группу, можно разделить методом двумерного хроматографирования с помощью указанного четырехкомпонентного растворителя, а также смеси бензол—этанол (4:1). Соединения третьей группы с  $R_f$  между 0,50 и 0,67 элюировали четырехкомпонентным растворителем и смесью циклогексан—этилацетат—этанол (9:9:2). Соединения четвертой группы, у которых величины  $R_f$  в смеси хлороформа и этанола превышают 0,67, разделяли смесью циклогексан—этилацетат—этанол (9:9:2). Для идентификации пятен разделенных стероидов используют семь различных цветных реакций. В работе [235] описано 30 цветных реакций, применяемых для идентификации 37  $\Delta^4$ -3-кето- $C_{21}$ -стероидов. Эта работа содержит данные по чувствительности, специфичности действия, там же указаны оптимальные условия применения обнаруживающих реагентов, а также механизм реакций (если таковые известны).

Лисбоа [236], применив восемь растворяющих систем, хроматографировал 40 21-дезоксид- $\Delta^4$ -3-оксостероидов на обычном силикагеле и на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра. Однако полностью разделить все эти соединения не удалось. Стевенс [237] хроматографировал группу кортикостероидов и родственных соединений, синтезированных из сапонинов. Он использовал слои адсорбента, пропитанного раствором нитрата серебра, и смеси хлороформ—этилацетат (1:1 и 9:1), хлороформ—толуол (1:1 и 4:1) и метилацетат—метилхлорид (4:1).

Фргачиц и Книвальд [238] нашли, что аскорбиновая кислота, введенная в слой силикагеля, предохраняет кортикостероиды от окисления при длительной экспозиции, необходимой при применении радиоавтографии. С этой целью пластинки опрыскивают насыщенным раствором аскорбиновой кислоты в абсолютном этаноле. Аскорбиновая кислота гасит флуоресценцию обычно флуоресцирующих слоев, так что для обнаружения разделенных соединений уже нельзя использовать УФ-облучение.

Тейлор [239] разработал методику выделения нанограммовых количеств меченых  $\Delta^4$ -3-оксостероидов из смесей, содержащих микрограммовые количества меченых  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -оксистероидов. Такая чувствительность определения достигается при хроматографировании на тонком слое силикагеля с 13 % сульфата кальция, к которому добавлено 10 % дигитонина. Элюирование проводят 4,5 ч смесью 2-метил-2-пропанол—вода—этилацетат (5:2:5).

Морено Дальмау и др. [240, 241] анализировали некоторые стероиды  $C_{21}$  на слоях из нерастворимого поливинилпирролидона. Эти слои приготавливали из продукта Polyclar AT (General Aniline and Film) с частицами размером 40 меш без введения связующего. Четыре противовоспалительных кортикостероида: гидрокортизон, преднизолон, 9 $\alpha$ -фторгидрокортизон и 9 $\alpha$ -фторпреднизолон—были разделены смесью соляная кислота ( $d$  1,19)—вода (1:9) [240]. Бетаметазон, дексаметазон и параметазон разделяли на таких же слоях, элюируя смесью дихлорметан—уксусная кислота (94:6) [241]. Бишара [242] разделил методом двумерного хроматографирования на слоях силикагеля шесть 6-фтор-16 $\alpha$ -оксикортикостероидов. Он трижды элюировал пробу в первом направлении смесью бензол—этилацетат (1:1) и затем дважды под прямым углом к первому направлению смесью хлороформ—уксусная кислота (20:1).

Уайтхауз и др. [243] изучали применение иода для обнаружения стероидов при хроматографировании на бумаге, а Мэттьюс [244] исследовал цветные реакции на тонкослойных хроматограммах под действием раствора ванилина в смеси серная кислота—этанол. В последнем случае чувствительность определения 36 изученных стероидов достигала по крайней мере 5 мкг/см<sup>2</sup>. Вечей и др. [245] добились увеличения чувствительности обнаружения кортикостероидов тетразолиевым реактивом на слоях силикагеля. С этой целью непосредственно в суспензию силикагеля, предназначенную для приготовления пластинок, вводят 100—200 мг тетразолиевого синего; приготовленные пластинки сушат при комнатной температуре 24 ч. Элюирующие растворители, в частности смеси хлороформ—этанол (9:1), дихлорметан—бензол—ацетон—этанол (75:10:10:5), не растворяют цветные обнаруживающие реактивы, введенные в слой силикагеля. Чтобы пятна окрасились, хроматограммы опрыскивают метанольным раствором гидроксида натрия (10 г щелочи на 100 мл 60 %-ного метанола). Реакцию можно остановить в желаемый момент, если опрыскать пластинку раствором 2 мл муравьиной кислоты в 100 мл метанола. Чтобы закрепить полностью обработанную хроматограмму, ее опрыскивают раствором пластика.

### Количественное определение

*Количественные работы общего характера.* Если стероиды уже разделены посредством ТСХ, то провести количественное определение этих соединений можно рядом методов. Старка и Маликова [208] обрабатывали пятна концентрированной серной кислотой [212] и определяли содержание стероидов колориметрически. Для выполнения количественного определения соскабливали с пластинки часть адсорбента, содержащую данный

стероид, и экстрагировали его небольшим количеством метанола, который предварительно подщелачивали, добавляя концентрированный гидроксид аммония. Растворитель испаряли в вакууме, сухой остаток смешивали с 5 мл концентрированной серной кислоты и выдерживали эту смесь 2 ч при комнатной температуре. После чего одновременно определяли оптическую плотность этого раствора, стандартного раствора и чистого растворителя.

Бернауэр [246, 247] использовал тетразолиевый синий реактив. По предложенному им методу полученную хроматограмму сначала сушили, затем опрыскивали щелочным раствором тетразолиевого синего так, чтобы она была хорошо смочена. Затем элюировали со слоя сине-фиолетовые пятна этанолом и измеряли оптическую плотность элюата при 546 нм. Чтобы снизить вероятность ошибки, на той же пластинке хроматографировали ряд проб стандартного вещества с постепенно меняющейся концентрацией.

Эту цветную реакцию, зависящую от наличия при атоме С-17 группы —СО—СН<sub>2</sub>—ОН, применяли также Кавина и Викари [204]. Они смешивали раствор пробы в 2 мл безводного, не содержащего примеси альдегидов этанола с 0,2 мл 1 %-ного раствора гидроксида тетраметиламмония в этаноле и 0,2 мл 0,5 %-ного раствора тетразолиевого синего в безводном этаноле. Смесь выдерживали час при 25°C в темноте, после чего добавляли к ней 1 мл уксусной кислоты и определяли оптическую плотность в максимуме поглощения. Флуоресцеин, введенный в слой силикагеля для обнаружения разделяемых соединений, не нарушал указанной цветной реакции. Кроме этого метода, Кавина и Викари использовали также спектрофотометрические измерения; однако в данном случае уже нельзя было предварительно вводить флуоресцеин в адсорбционный слой, так как при этом искажались результаты. Нишикази и др. [248, 249] и Луизи и др. [250, 251] также применяли тетразолиевый синий для количественного определения кортикостероидов в моче. Адамек и др. [252] после обнаружения пятен соединений тетразолиевым синим определял содержание этих соединений колориметрически с помощью реакции Портера—Зильбера [253] с фенилгидразином.

Определяя содержание ацетата 6-хлор-17 $\alpha$  оксипрегнадиен-4,6-диола-3,20, Берд и др. [254] измеряли коэффициент поглощения при 283 нм. Безусловно, оптимальная для измерения коэффициента поглощения длина волны при этом должна меняться от соединения к соединению. Мэттьюс и др. [255] применяли спектрофотометрический метод. Феер и др. [256] для определения содержания прегнандиола в моче измеряли после разделения пробы методом ТСХ коэффициент поглощения при длинах

волн 390, 425 и 460 нм. Одновременно в той же пробе мочи можно определить содержание прегнантриола.

Хара и др. [257] разработали двумерный сканирующий денситометр с самозаписывающим интегратором для анализа тонкослойных хроматографических пластинок. Этим прибором, в частности, было с точностью  $\pm 5\%$  определено содержание стероидов. Выявлен ряд источников погрешностей (см. т. 1, гл. XI, разд. 2).

Молина-Андреу и др. [258] определяли содержание прегнандиола путем непосредственной денситометрии пятен после обнаружения опрыскиванием реактивом, содержащим сульфит натрия и серную кислоту. Белова и др. [259] разделяли находящиеся в пробах мочи кортикостероиды на слоях силикагеля, содержащих тетразолиевый синий. После хроматографического разделения они опрыскивали пластинки 10 %-ным раствором гидроксида натрия в 60 %-ном метаноле; на пластинках после опрыскивания появлялись сине-фиолетовые зоны. Количественное определение проводилось прямым денситометрированием пятен. Ютвиллер и Келлер [260] определяли содержание гидрокортизона, кортизона, кортикостерона и соединения S в плазме крови методом отражательной денситометрии. Этот метод позволяет определять соединения при содержании их до 0,1—0,2 мкг на пятно. Хамман и Мартин [261] пользовались прямым измерением интенсивности флуоресценции.

В работе [262] описана методика количественного определения альдостерона. Этот стероид экстрагируют с тонкого слоя 1 мл концентрированной серной кислоты; с этой целью кислоту смешивают с силикагелем и выдерживают час при комнатной температуре. Далее взвесь центрифугируют, полученный раствор нагревают на масляной бане еще час при 100°C, охлаждают в ледяной воде и измеряют интенсивность флуоресценции альдостерона. Определяя содержание альдостерона в моче, Нишикази и Штаудингер [249] сначала предварительно очищали пробу, чтобы удалить ненужные примеси, а затем методом двумерной ТСХ отделяли альдостерон от других стероидов. Пробу наносили на слой силикагеля и элюировали смесью циклогексан—изопропанол (7:3) в одном направлении и смесью хлороформ—уксусная кислота (4:1) в другом. Из-за малого содержания альдостерона нецелесообразно опрыскивать его пятна обнаруживающим реактивом. Альдостерон находят по положению его пятна относительно пятен 11-дезоксикортизола и 11-дегидрокортизона, которые опрыскивали тетразолиевым синим. После того как пятно альдостерона обнаружено, стероид можно количественно экстрагировать и определить его содержание колориметрически с тетразолиевым синим.

Применив специальные меры предосторожности, Фью и Форурд [263] смогли определить содержание кортикостероидов вплоть до уровня 0,001 мкг, используя после элюирования флуоресцентный метод.

Футтервейт и др. [264] анализировали методом газовой хроматографии элюаты прогестерона, полученные после хроматографирования на тонком слое проб плазмы крови беременных женщин. Коллинз и Соммервилл [265] также пользовались газовой хроматографией для количественного определения прогестерона в плазме крови человека. Экстракт плазмы разделяли на силикагеле G, элюируя сначала смесью бензол—этилацетат (3:2), а затем смесью эфир—диметилформамид (99:1). Пятна стероидов экстрагировали смесью метанол—хлороформ (1:1) и столбчатый экстракт вводили в газохроматографическую колонку, на входе в которую расположена сетка из нержавеющей стали. Эта колонка длиной 152 см была заполнена хромосорбом Р (фракция 60—80 меш) с 1% диметилсукцината, который наносили на хромосорб из раствора в циклогексане. Рабочая температура колонки равнялась 210°C. Пик прогестерона идентифицировали, подмешивая 0,25 мкг прогестерона-4-<sup>14</sup>C к исходной плазме. Этим методом можно определить до 0,01 мкг этого соединения.

Для газохроматографического определения некоторые авторы использовали также триметилсилиловые эфиры оксистероидов после разделения этих эфиров на силикагеле смесью циклогексан—этилацетат (9:1) [266].

*Определение содержания прегнандиола как способ обнаружения ранней стадии беременности.* Поскольку после зачатия содержание прегнандиола в моче возрастает за 10—14 дней до 7—10 мг/л по сравнению с 3—5 мг/л после овуляции при нормальном менструальном цикле, Вальди и др. [267] предложили полуколичественный метод определения этого соединения в качестве способа обнаружения ранней стадии беременности. Предложенный метод основан на применении скоростной ТСХ. Впоследствии этот вопрос был рассмотрен в ряде работ [268—270]. Исследование рекомендуется проводить следующим образом. К 20 мл профильтрованной мочи (желательно из суточного сбора) добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты (*d* 1,19), полученную смесь нагревают точно 10 мин при 90°C, быстро охлаждают проточной водой до комнатной температуры, переводят эту смесь в делительную воронку емкостью 100 мл и трижды экстрагируют циклогексаном порциями по 25 мл. Полученный экстракт дважды обрабатывают 1 н. раствором гидроксида натрия порциями по 20 мл и дважды промывают водой порциями по 30 мл, после чего сушат над 5—7 г безводного сульфата натрия. Просушенный экстракт фильтруют, а сульфат натрия промывают не-

сколькими миллилитрами циклогексана, добиваясь количественного перехода. Далее на водяной бане при температуре не выше 40°C упаривают экстракт под вакуумом досуха. Четырьмя порциями хлороформа переводят этот остаток в толстенькую пробирку емкостью 20 мл и еще раз полностью выпаривают хлороформ на водяной бане. Остаток растворяют в 0,5 мл хлороформа и этот раствор наносят на пластинки.

Хроматографическая пластинка имеет ряд желобков, в которых находится силикагель, причем в каждом желобке можно хроматографировать отдельную пробу. В эти желобки вводят пробы в следующем порядке: 1) контрольный раствор красителя; 2) 2 мкг прегнандиола из стандартного раствора; 3) 50 мкл экстракта мочи; 4) 5 мкг прегнандиола; 5) 50 мкл экстракта мочи; 6) 10 мкг прегнандиола; 7) 50 мкл экстракта мочи; 8) 15 мкг прегнандиола; 9) 50 мкл экстракта мочи; 10) 20 мкг прегнандиола; 11) 50 мкл экстракта мочи; 12) 30 мкг прегнандиола; 13) контрольный раствор красителя (тот же, что и вначале). Элюирование ведут смесью хлороформ—ацетон (9:1) в камере с насыщенной атмосферой. Если  $R_f$  прегнандиола обнаруживается вверху пластинки, а не в нижней трети, то в качестве растворителя используют смеси хлороформ—ацетон (4:1) или метиленхлорид—ацетон (4:1). Пластинку элюируют на 10 см, что занимает около 30 мин.

Для обнаружения стероидов пластинку опрыскивают сначала 40%-ным водным раствором фосфорной кислоты и затем нагревают 7—20 мин при 110°C. Прегнандиол обнаруживается при УФ-облучении в виде бледного зеленовато-серого пятна. Обнаружение его можно подтвердить, опрыскивая 1,5%-ным раствором фосфомолибденовой кислоты в 96%-ном этаноле, при этом пятно прегнандиола сразу становится синим. Количественная оценка проводится посредством сравнения с пятнами стандартов.

В ряде работ описаны различные модификации этой методики [208, 271—275].

## 5. ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

### Качественное разделение

Для разделения желчных кислот и их производных применяли ряд различных хроматографических систем. Фрош и Вагенер [276] разделяли эти кислоты на слоях силикагеля G, используя как элюирующий растворитель смесь толуол—уксусная кислота—вода (7,5:12,5:1). С помощью этой системы таурохолевая и тауролитохолевая кислоты были отделены от тауриновых конъюгатов диоксихолановых кислот. Тауродезоксихолевая и таурохенодесоксихолевая кислоты характеризуются одинаковой



величиной  $R_f$ . Положения пятен этих кислот на хроматограммах фиксировали при наблюдении в УФ-свете после опрыскивания раствором трихлорида сурьмы в уксусной кислоте (1:1). Те же авторы [277] применяли также двумерную хроматографию на слоях кизельгура G. В этом случае пробу элюировали в одном направлении смесью бутанол—уксусная кислота—вода (10:1:1). Элюирование проводили 5 ч при 18°C в камере с насыщенной атмосферой. По окончании элюирования пластинки вынимали из хроматографической камеры, испаряли бутанол в токе холодного воздуха и 12 ч сушили пластинки над силикагелем. Хроматографирование во втором направлении вели в течение 2 ч смесью толуол—уксусная кислота—вода (7,5:12,5:1). Генсхирт и др. [278] также использовали смесь толуол—уксусная кислота—вода для разделения холевых кислот перед количественным определением их. Эти авторы нашли, что верхняя фаза этой смеси с соотношением компонентов 5:5:1 наиболее пригодна для разделения на слоях силикагеля индивидуальных холевых кислот и для отделения индивидуальных кислот от сопряженных желчных кислот. Разрешение как свободных, так и сопряженных желчных кислот завершали на растворяющей смеси тех же компонентов, но с соотношением 10:10:1. Обнаруживающим реактивом служил свежеприготовленный 5%-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в смеси этанола с эфиром (1:1), после опрыскивания которым и последующего 5-минутного нагревания при 100°C желчные кислоты обнаруживались в виде синих пятен на желтом фоне.

Кричевский и др. [279] элюировали пробы на силикагеле смесями эфир—петролейный эфир—метанол—уксусная кислота (70:30:8:1) и изооктан—изопропиловый эфир—уксусная кислота (2:1:1). В качестве обнаруживающего реактива они использовали раствор 0,5 мл анисового альдегида и 1 мл концентрированной серной кислоты в 50 мл уксусной кислоты. Эти авторы составили таблицу различных цветных реакций. Энерот [280] исследовал хроматографические характеристики 40 желчных кислот в 17 различных растворяющих системах (табл. 29.9). Для обнаружения пятен он опрыскивал пластинки концентрированной серной кислотой и прокаливал их до 240°C. Анализ полученных данных позволил сделать ряд выводов о влиянии различных факторов на разделение. Кислоты с оксигруппами у атомов C-3 более полярны, чем соответствующие соединения с оксигруппами у атомов C-7 и C-12. Для кислот с одной оксигруппой или одной оксогруппой в молекуле наблюдался следующий порядок изменения полярности:  $3\alpha > 3\beta > 7\beta > 12\beta > 7\alpha \approx 12\alpha > 3\text{-оксо} > > 7\text{-оксо} > 12\text{-оксо}$ . При наличии нескольких заместителей установить вклад отдельных групп в полярность данного соединения труднее, однако и в этом случае видно влияние  $3\alpha$ -оксигруппы

на полярность. Сравнение с двумя метиловыми эфирами показало, что эфиры значительно легче поддаются разделению, чем соответствующие свободные кислоты.

Шварц и Сихора [203] разделили смесь 12 желчных кислот на незакрепленных слоях оксида алюминия, обработанных 2,5%-ным раствором уксусной кислоты. При разделении они применяли два растворителя—хлороформ и смесь хлороформа с этанолом (98:2). Метиловые эфиры эти авторы элюировали смесями бензол—этанол (97:3) и петролейный эфир—хлороформ (1:1).

Барбье и др. [15] разделили на слоях силикагеля G смесь метиловых эфиров холевой, дезоксихолевой и этиановой кислот. Чтобы получить величины  $R_f$  каждого из этих соединений, они применяли три различные смеси этилацетата и циклогексана с соотношением компонентов 3:17, 3:7 и 1:3. Холевую и дезоксихолевую кислоты разделяли на пластинках со слоем кремневой кислоты, закрепленной крахмалом; элюировали пробу уксусной кислотой. В этой системе получены следующие величины  $R_f$ : холевая кислота 0,32 и дезоксихолевая кислота 0,62. Хара и Такеучи [281—283] разделили 57 желчных кислот и их производных на пластинках с силикагелем, используя для разделения сложных эфиров различные смеси бензола или гексана с диэтиловым эфиром, а для разделения кислот—смеси диэтилового эфира с уксусной кислотой.

Усуи [284] анализировал желчные кетокислоты на слоях кремневой кислоты, элюируя пробы смесью бензол—уксусная кислота (9:1 и 7:3). Чтобы обнаружить разделенные соединения, он сначала обрабатывал хроматограмму 5%-ным раствором боргидрида натрия в 80%-ном метаноле, затем опрыскивал ее раствором 5 г фосфомолибденовой кислоты в смеси 100 мл уксусной кислоты и 5 мл концентрированной серной кислоты и в заключение нагревал ее 5—10 мин при 110°C. Косс и др. [285] разделили несколько желчных кислот на слоях силикагеля, нанесенных на алюминиевую фольгу. Шварц [157] хроматографировал 7 желчных кислот на силикате магния со смесями хлороформ—этанол (96:4) и хлороформ—уксусная кислота (99:1 и 96:4). Гофман [286, 287] использовал силикагель и смесь уксусная кислота—тетрахлорид углерода—диизопропиловый эфир—изоамилацетат—*n*-пропанол—бензол (5:20:30:40:10:10), а также смесь пропионовая кислота—изоамилацетат—вода—*n*-пропанол (15:20:5:10). Несколько свободных и сопряженных кислот были разделены на активированном при 160°C оксиапатите с применением метилизобутилкетона в качестве элюирующего растворителя. В другой статье Гофмана [288] описывается методика хроматографирования девяти соединений и разделение производных желчных кислот на тонких

Величины  $R_{st} \times 100$  желчных кислот, полученные на силикателе G с различными растворителями [230]<sup>а, б</sup>

Соединение В	$R_x$										$R_\theta$	$R_s$	$R_\theta$	$R_s$	$R_\theta$		$R_s$					
	5,0	9,7	$R_\theta$	4,7	8,5	4,0	5,2	5,1	9,0	4,7					9,8	12,0		9,1	5,7	9,1	8,9	7,5
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К					Л	М		Н	О	П	Р	С
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,23 $\xi$		13	4	17	12	7	13	28	6	8												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,23 $\xi$			15	62	43	25	85	43	26	28												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,16 $\alpha$			67	208	141	250	214	254	162	179												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -C <sub>27</sub>			13	152	128	161	196	188	138	189												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$	34		17	100	100	100	100	100	100	100												
3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$				127	114	144	100	100	87	101												
3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,12 $\alpha$			30	146	117	147	159	175	122	140												
3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$			30	135	105	130	147	149	112	136												
3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$				115	98	117	117	114	82	83												
3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$				125	89	111	112	86	92	87												
7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,3-Оксо			131	282	155	294	228	302	166	204												
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,7-Оксо			45	195	115	192	183	232	137	163												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12-Оксо			66	195	115	194	185	232	137	163												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12-Диоксо	116		85	107	130	258	194	265	152	139												
3 $\alpha$ ,7 $\alpha$	100		100																			
3 $\beta$ ,7 $\alpha$			126																			
3 $\alpha$ ,7 $\beta$			114																			
3 $\alpha$ ,12 $\alpha$	100		86	100	128	259	348	268	167	233												
3 $\beta$ ,12 $\alpha$			136																			
3 $\alpha$ ,12 $\beta$			158																			
3 $\alpha$ ,6 $\alpha$			63	186	112	180	202	224	124	170												

7 $\alpha$ ,12 $\alpha$			251															
3,7,12-Триоксо	158		100	213														
3 $\alpha$ ,7-Оксо	138		90	163														
3 $\alpha$ ,12-Оксо	138		178															
7 $\alpha$ ,3-Оксо			99	213														
12 $\alpha$ ,3-Оксо			185															
3,7-Диоксо	156		108	265														
3 $\alpha$	156		100	254														
3,12-Диоксо	156		108	265														
7 $\alpha$			112	320														
7 $\beta$																		
12 $\alpha$																		
12 $\beta$																		
3-Оксо	162		113	310														
7-Оксо																		
12-Оксо																		
Незамещенная кислота																		

<sup>а</sup> С разрешения автора и American Institute of Biological Sciences.

<sup>б</sup> Стандартные соединения: холевая (х), дезоксихолевая (θ) и литохолевая (н) кислоты.  $R_x$ ,  $R_\theta$ ,  $R_s$  — подвижность стандартных соединений, т. е. пройденное ими расстояние в сантиметрах. Расстояние, пройденное растворителем в ненамеченной системе, составляет 17–18 см. Растворители: А — диэтилоксалат — диоксан (40 : 10); Б — диэтилоксалат — изопропанол (48 : 8); В — бензол — диоксан — уксусная кислота (75 : 20 : 20); Г — бензол — диоксан — уксусная кислота (20 : 10 : 2,0); Д — бензол — диоксан — уксусная кислота (15 : 5 : 2,0); Е — бензол — диоксан — уксусная кислота (55 : 40 : 2,0); Ж — циклогексан — этилацетат — уксусная кислота (10 : 15 : 4,0); З — циклогексан — этилацетат — уксусная кислота (7 : 23 : 3,0); И — бензол — изопропанол — уксусная кислота (30 : 10 : 1,0); К — циклогексан — изопропанол — уксусная кислота (30 : 10 : 1,0); Л — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (10 : 10 : 2,0); М — триметилпентан — изопропанол — уксусная кислота (60 : 20 : 0,5); Н — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (10 : 10 : 2,0); О — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (5 : 25 : 0,2); П — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (50 : 50 : 0,7); Р — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (10 : 10 : 0,25); С — триметилпентан — этилацетат — уксусная кислота (10 : 10 : 0,1).

<sup>в</sup> Оксигруппы обозначены греческими буквами. С<sub>27</sub> — копростановая кислота.

слоях, нанесенных на предметные стекла микроскопа [289].

Авторы работы [290] подвергали слои силикагеля G предварительной обработке, помещая их на 30 мин в камеру, атмосфера которой насыщена парами хлорида лития. Для элюирования они применяли смесь изооктан—уксусная кислота—изопропиловый эфир—изопропанол (10:6:5:1). Чтобы отделить желчные кислоты и их эфиры от жирных кислот, которые могут мешать последующему газохроматографическому и спектральному анализу, Спирс и др. [291] сначала проводили элюирование на слоях силикагеля смесью гексан—хлороформ—диэтиловый эфир—*n*-бутанол—уксусная кислота (40:10:10:3:0,5) в насыщенной атмосфере. После этого они осматривали пластинки в коротковолновом УФ-свете и проводили борозду под пятнами жирных кислот. Чтобы разделить желчные кислоты, элюирование повторяли, но на этот раз применяли смесь изооктан—этилацетат—*n*-бутанол—*n*-пропанол—уксусная кислота (20:10:3:3:3). Метилированные желчные кислоты разделяли при втором элюировании смесью изооктан—изопропанол—уксусная кислота (120:40:1). При появлении прожилок дезоксихолевой кислоты из состава элюирующей смеси исключали *n*-пропанол и увеличивали концентрацию в ней уксусной кислоты.

В сочетании с силикагелем применяют многочисленные растворяющие системы. Хуанг и Николс [292] испытали 14 таких систем и сравнили полученные результаты с результатами разделения смесью хлороформ—метанол—вода (70:25:3). Они составили таблицу величин  $R_f$ . Икава и Гото [293] опубликовали таблицу величин  $R_f$  16 желчных кислот и их конъюгатов в 6 растворителях на силикагеле Н (тип 60). Для разделения некоторых сложных смесей оказалось целесообразным применять двумерное хроматографирование смесями хлороформ—этанол—28%-ный аммиак (25:35:1) в одном направлении и хлороформ—этанол—этилацетат—уксусная кислота—вода (8:6:5:4:1) — в другом.

Чтобы удалить липиды из экстрактов сыворотки перед разделением свободных желчных кислот и их конъюгатов, Бегеман [294] проводил на слое силикагеля непрерывное элюирование смесью хлороформ—диэтиловый эфир (6:1). Оставшиеся на стартовой линии желчные кислоты он хроматографировал затем смесью бутанол—уксусная кислота—вода (100:7:5). Панвеливалла и др. [295] удаляли липиды непрерывным 2-часовым нисходящим элюированием хлороформом. Затем они разделяли свободные желчные кислоты и глициновые конъюгаты, элюируя пробу 15 ч в восходящем направлении смесью 2,2,4-триметилпентан—изопропанол—изопропиловый эфир—уксусная кислота (2:1:1:1). Тауриновые конъюгаты они разделяли на клиновидных (с основанием у начала элюирования) полосках элюирова-

нием смесью пропионовая кислота—изоамилацетат—вода—*n*-пропанол (3:4:1:2).

В работе [296] описана методика разделения шести структурных изомеров ди- и триоксихолановых кислот на полиамиде при элюировании смесью вода—2-бутанол—25%-ный раствор аммиака (16:4:1) или 0,05 н. раствором гидроксида натрия. Для обнаружения пятен кислот проводили опрыскивание реагентом, содержащим фосфомолибденовую кислоту.

Антони и Беер [297] определяли окраску пятен 12 желчных кислот и 6 их конъюгатов при обработке 4 обнаруживающими реактивами. Для обнаружения желчных кислот и их конъюгатов можно использовать и другие обнаруживающие реактивы, а именно сульфат церия-аммония—молибдат (Т-52) [298], модифицированный реактив Каги—Мишера (Т-26) [299] и хлорид марганца (Т-159) [300]. С помощью любого из этих трех реактивов можно различить хенодезоксихолевые и дезоксихолевые кислоты, которые не всегда удается различить по величинам  $R_f$ . Обработывая хроматограмму хлоридом марганца, можно отличить от жирных кислот холестерин, пятна которого окрашиваются в розовый цвет, но через 5 мин бледнеют.

### Количественное определение

Генсхирт и др. [278] определяли содержание желчных кислот спектрофотометрически. После разделения компонентов смесей, проведенного, как описано выше, они просушивали хроматографические пластинки в течение 20 мин при 100°C. Положение разделенных соединений определяли, опрыскивая пластинки водой. В результате такой обработки холевые кислоты обнаруживались в виде белых пятнышек на прозрачном фоне. Эти пятна соскабливали в центрифужную пробирку и в течение часа обрабатывали 3 мл 65%-ной серной кислоты при 60°C. Длина волны максимума поглощения менялась в зависимости от длительности нагревания, оптимальным было признано 60-минутное нагревание. После этого снимали кривые поглощения (относительно силикагеля) соединений в области 300—450 нм. Количественные измерения проводили при 380 нм, потому что при длине волны менее 320 нм интенсивно поглощает силикагель, обработанный серной кислотой. Описанным способом нельзя определить литохолевую кислоту, так как она не имеет максимума поглощения при 380 нм. Волленвебер и др. [301] устанавливали этим методом содержание хенодезоксихолевой и дезоксихолевой кислот в содержимом двенадцатиперстной кишки пациента. Фрош и Вагнер [302—304] также применяли спектрофотометрический метод для количественного определения желчных кислот. Они устанавливали содержание каждого компонента в пробе, измеряя сумму

и разность коэффициентов поглощения при 412 и 408 нм и сравнивая полученные результаты с данными для смесей известного состава.

Иствуд и др. [305] определяли содержание желчных кислот и их конъюгатов с помощью хромогена Петтенкофера. Для этого в 5 мл 70 %-ной серной кислоты погружали соскобленное с хроматограммы пятно и нагревали смесь 10 мин при  $42 \pm 2^\circ\text{C}$ . После этого добавляли 1 мл 0,25 %-ного раствора фурфурола и выдерживали полученную смесь в течение часа. Через 90 мин после добавления фурфурола измеряли поглощение при 510 нм отцентрифугированного верхнего слоя.

Хара и др. [306] применяли прямой денситометрический метод определения желчных кислот. Пробу разделяли на пластинках с силикагелем, элюируя двумя смесями: изоамиловый спирт—уксусная кислота—вода (18 : 5 : 3) и бензол—уксусная кислота—вода (10 : 10 : 1). Перед нанесением пробы проверяли постоянство коэффициента поглощения по всей пластинке. После завершения разделения хроматограммы нагревали в течение часа при  $130^\circ\text{C}$ , чтобы испарить весь растворитель, а затем равномерно опрыскивали их концентрированной серной кислотой. Далее нагревали пластинку 20 мин при  $60\text{—}80^\circ\text{C}$ , следя за тем, чтобы она нагревалась равномерно. Сравнивая полученные коэффициенты поглощения с соответствующими величинами на калибровочной кривой, получали полуколичественные результаты. Таким образом были исследованы взятые у 21 вида животных пробы желчи, причем рисунки всех полученных хроматограмм различались.

Семенук и Беер [307] применяли прямой денситометрический метод после опрыскивания слоя 20 %-ным раствором фосфомолибденовой кислоты и 15-минутного нагревания при  $110^\circ\text{C}$ . Ким и Кричевский [308] обугливали хроматограммы и проводили прямое денситометрическое определение.

Козн и др. [309] после хроматографирования на тонком слое переводили желчные кислоты в их триметилсилиловые эфиры для количественного определения методом газовой хроматографии.

## 6. СТЕРОИДНЫЕ САПОГЕНИНЫ И САПОНИНЫ

Сапонины — это гликозиды, водные растворы которых образуют при встряхивании устойчивую пену. При кислотном гидролизе сапонины расщепляются на сахара и соответствующие сапогенины. Разделение стероидных сапогенинов можно проводить на слоях силикагеля. Чеше и др. [310—312] исследовали ряд сапогенинов методом хроматографии на бумаге и ТСХ. В качестве растворителей в ТСХ использовали этилацетат и смеси хлороформ—ацетон (4 : 1) и диизопропиловый эфир—ацетон (3 : 1).

Такеда и др. [313] и Мацумото [314] исследовали разделение стероидных сапогенинов 25 различными элюирующими растворителями и выбрали наиболее эффективные. В табл. 29.10 приведены величины  $R_f$  20 сапогенинов, полученные с 8 различными растворителями.

Бенетт и Хефтман [315] разделяли стероиды этой группы методом адсорбционной хроматографии на силикагеле G и методом распределительной хроматографии на кизельгуре. В первом случае они элюировали пробы следующими смесями: дихлорметан—метанол—формамид (93 : 6 : 1), толуол—этилацетат—муравьиная кислота (57 : 40 : 3), циклогексан—ацетон (1 : 1), циклогексан—этилацетат—вода (600 : 400 : 1 и 1000 : 1000 : 3), а также хлороформ—метанол—вода (485 : 15 : 1 и 188 : 12 : 1). Две пары изомеров С-25, которые не разделяются на силикагеле G, удалось разделить на смеси силикагеля G и кизельгура G, взятых в соотношении 1 : 1, применяя в качестве растворителя смесь хлороформ—толуол (9 : 1). С этим же самым растворителем получено хорошее разделение ацетатов изомеров С-25 на силикагеле G. Пластинки со слоем кизельгура G, предназначенные для разделения методом распределительной хроматографии, пропитывали водой. С этой целью пластинки клали слоем адсорбента вниз на химический стакан с кипящей водой и выдерживали их в таком положении до тех пор, пока слой адсорбента не смачивался полностью. Затем давали воде испаряться с пластинки до тех пор, пока не начинал высушиваться адсорбент на углах этой пластинки, после чего ее переносили в хроматографическую камеру. Важное значение имеет то, какое количество воды остается на пластинке, потому что при очень большом содержании воды пятна растекаются и вследствие этого разделение плохое, а при недостаточном содержании воды на хроматограмме образуются хвосты. Разделение методом распределительной хроматографии проводят в камере, атмосфера которой приводится в равновесие с находящимися в ней жидкостями. Для этого в камеру с одной стороны помещают листок фильтровальной бумаги, погруженный в элюирующий растворитель, а с другой стороны — насыщенный водой листок фильтровальной бумаги, который не должен касаться растворителя. Трифторацетаты можно элюировать смесью хлороформа и толуола. Эти производные получают, нанося трифторуксусный ангидрид непосредственно на находящуюся на пластинке пробу оксистероида. Затем пластинку тщательно сушат, чтобы испарить с нее образовавшуюся как побочный продукт трифторуксусную кислоту. Можно также непосредственно добавить 2 мкл трифторуксусного ангидрида к 0,2 мл 0,01—0,1 %-ного раствора сапогенинов в гексане или дихлорметане. Эту смесь в течение минуты тщательно встряхивают и затем нейтрализуют 1 мл 2 н. водного

Величины  $R_f \times 100$  ряда стероидных сапогенинов, полученные на силикагеле с различными растворителями (длина пути элюирования 15 см) [314]<sup>a</sup>

Сапогенин	Хлороформ — этанол (95 : 5)	Хлороформ — ацетон (9 : 1)	Бензол — ацетон (85 : 15)	Бензол — метанол (82 : 8)	n-Гексан — этилацетат (1 : 1)	n-Гексан — ацетон (4 : 1)	Бензол — этанол (85 : 15)	Бензол — этанол (92 : 8)
Лювогенин	87	76	80	85	80	78	93	72
Неомтеогенин	81	52	63	66	64	48	85	48
Метеогенин	81	52	63	66	64	48	85	48
Сарсапагенин	65	39	46	51	51	42	67	51
Диосгенин	59	35	41	42	46	31	57	25
Тигогенин	59	35	39	39	46	23	53	23
Пенногенин	53	26	30	42	35	22	50	27
Гентрогенин	49	24	25	32	26	16	42	24
Гекогенин	46	22	22	37	21	16	42	25
Ковальямарогенин	39	21	24	30	28	22	42	22
Изородеасапогенин	39	18	25	38	28	22	17	24
Родеасапогенин	37	18	25	32	28	22	47	22
Ногирагенин	27	11	15	20	18	15	37	18
Гелоногенин	26	7	13	16	16	11	30	18
Ионогенин	21	11	11	17	13	9	30	18
Титогенин	19	7	11	16	11	11	35	15
Токорогенин	9	2	2	12	3	4	27	10
Метатенин	6	1	1	9	2	1	23	7
Китигенин	4	1	1	10	0	1	20	0
Когатенин	3	1	1	8	0	0	23	5

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Pharmaceutical Society of Japan

раствора карбоната натрия. На пластинку непосредственно наносят раствор неочищенной смеси в органическом растворителе.

Бланден и Гардмен [316] использовали силикагель G для разделения неочищенных смесей сапогенинов, содержащихся в клубнях *Dioscorea*; Сандер и др. [317—319] широко применяли ТСХ для анализа сапогенинов *Solanum* и других стероидных сапогенинов. Болл [320—321] исследовал сапогенины 13 различающихся географически штаммов *Solanum dulcamara*. Кун и Лев [322] изучали сапогенины *Solanum chacoense*. Чиарло [323] выделял сапогенины цветков *Nerium oleander*. Шрейбер и др. [324] исследовали 10 стероидных сапогенинов.

Смит и Фелль [114] разделили смесь 14 сапогенинов и их ацетатов на слоях силикагеля, закрепленных крахмалом (табл. 29.11).

Таблица 29 11

Величины  $R_f \times 100$  стероидных сапогенинов, полученные на закрепленных крахмалом слоях силикагеля [114]<sup>a</sup>

Сапогенин	Гексан — этилацетат (4 : 1)	Гексан — этилацетат (1 : 1)	Этилацетат
Диосгенин	18	67	
3-Ацетат диосгенина	73		
Тигогенин	18	67	
3-Ацетат тигогенина	74		
Смилагенин	26	72	
3-Ацетат смилагенина	73		
Гекогенин	2	31	58
3-Ацетат гекогенина	26	89	
3-Ацетат гентрогенина	25	89	
3-Ацетат сарсапагенина	68		
Хлорогенин	0	4	18
Криптогенин	0	22	25
Пенногенин	4	48	68
Томатидин	0	2	3

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co

Давидар и Файез [325] разделяли содержащиеся в пажитнике греческом сапогенины на пропитанном раствором нитрата серебра оксиде алюминия G и на силикагеле G, используя как

растворитель смеси гексан—этилацетат (5:1 и 20:1). Ацетаты, разделенные смесью этих же растворителей, но с соотношением компонентов 100:7, определены фотометрически после обработки слоя фосфомолибденовой кислотой и прокаливании. Хельд и Вагуйфальви [326] разработали методику определения на тонких слоях как нейтральных, так и основных сапогенинов. После гидролиза, проведенного с тем, чтобы выделить конъюгаты кислот, полученный экстракт хроматографировали на силикагеле смесью циклогексан—этилацетат—вода (60:40:0,1). В такой хроматографической системе не удалось разделить шесть нейтральных сапогенинов типа 3 $\beta$ -моноолов, но можно было для этого дополнительно использовать другие растворяющие системы. Эпимеры C<sub>25</sub> разделяли смесью дихлорметан—диэтиловый эфир (199:1), а их ацетаты смесью дихлорметан—толуол (7:3). Пары насыщенного и ненасыщенного соединений можно разделить, элюируя смесью бензол—диэтиловый эфир (1:1).

Используя как элюирующий растворитель бутанол, насыщенный 5 %-ной уксусной кислотой, Мадаева и Рыжкова [327] анализировали сапонины *Dioscorea tokoro* и *D. gracillima* на слоях закрепленной гипсом целлюлозы. Каррерас Матас [328] хроматографировал стероиды на слоях силикагеля, пропитанного формамидом. Ван Дуурен [329] разделил на слоях силикагеля нестероидные сапонины, содержащиеся в сахарной свекле, элюируя пробу смесями гексан—этилацетат (1:1) и бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1). Хорлин и др. [330] хроматографировали группу тритерпеноидных сапонинов. Болл [320, 321] использовал силикагель и нейтральный оксид алюминия для разделения сапонинов *Solanum dulcamara*. В качестве элюирующих растворителей применяли смесь хлороформ—метанол (19:1), а также верхнюю фазу смеси этилацетат—пиридин—вода (3:1:3). Кавасаки и Мияхара [331] привели список величин  $R_{st}$  (относительно трилина) 14 стероидных сапонинов, полученных на закрепленных гипсом слоях силикагеля со следующими четырьмя растворителями: насыщенным водой бутанолом, нижней фазой смеси хлороформ—метанол—вода (65:35:10), смесью хлороформ—метанол (4:1) и верхней фазой смеси бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). В этой работе даны также величины метилированных и ацетилированных производных.

Вольф и Томас [332] хроматографировали на силикагеле сапонины соевых бобов и сапогенины; сапонины элюировали 6 раз смесью хлороформ—метанол—вода (65:25:4), сапогенины—один раз смесью петролейный эфир—хлороформ—уксусная кислота (7:2:1).

Пазих [333] исследовал 7 различных методов количественного определения сапонинов и предложил проводить их разделение на тонкослойных хроматографических пластинках, а за-

тем определять спектрофотометрически содержание выделенных сапонинов. Согласно предложенному этим автором методу, сапонины элюируют на силикагеле смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (6:1:3), а чтобы определить положение пятен, обрабатывают хроматограммы парами иода. После того как положение пятен установлено, иод удаляют возгонкой, пятна соскабливают и обрабатывают их раствором хлорида железа(II) в реагенте Зака [334], содержащем уксусную и серную кислоты. Силикагель отделяют центрифугированием, после чего измеряют поглощение при 445 нм. Погрешность анализа составляет около  $\pm 1,25$  %.

## 7. СТЕРОИДНЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Соединения этой группы родственны сапогенинам, они встречаются в виде гликозидов. Из ростков картофеля *Solanum tuberosum* выделены сапогенины—алкалоиды этой группы, получившие наибольшую известность.

Соланин, хаконин и соланидин можно разделить на тонких слоях силикагеля G [335], тогда как выделить соланидин методом хроматографии на бумаге не удастся. Из 8 примененных элюирующих смесей наиболее эффективной оказалась смесь уксусная кислота—95 %-ный этанол (1:3). Величины  $R_f$  перечисленных трех соединений, полученные с этой смесью при длине пути элюирования 12—15 см, соответственно равны 0,22; 0,54 и 0,62. Шрайбер и др. [342, 336—340], Болл [320, 321], а также Кун и Лев [322] исследовали методом ТСХ алкалоиды, выделенные из растений семейства *Solanum*. Тонкие слои приготавливали из чистого силикагеля и силикагеля, пропитанного нитратом серебра, а также из оксида алюминия. Байт и др. [341] исследовали алкалоиды, содержащиеся в *Solanum laciniatum*; гликозиды они хроматографировали на силикагеле бутанолом, насыщенным водой, а агликоны—на оксиде алюминия, элюируя пробы хлороформом.

Ляблер и Черны [342, 343], а также Ляблер, Черны и др. [344] исследовали стероидные алкалоиды *Hollarhena antidysenterica*. Они изучили 52 основания [342], хроматографируя их на тонких слоях силикагеля с бензолом и эфиром, насыщенными аммиаком. Хроматографическую камеру выстилали изнутри фильтровальной бумагой и, кроме того, в нее помещали чашку, заполненную концентрированным раствором аммиака.

Цейтлер [345] хроматографировал на силикагеле HF (Merck) некоторые стероидные алкалоиды, выделенные из чемерицы, а также их производные, элюируя пробы смесями циклогексан—диэтиламин (9:1 и 7:3). При многократном элюировании разделение улучшалось.

## 8. ЯДЫ ЖАБ

Зельник и др. [346, 347] выделили методом ТСХ и идентифицировали буфадиенолиды, или буфогенины, извлеченные из околоушных желез бразильской жабы. В табл. 29.12 даны величины  $R_f$  этих соединений, полученные с 4 различными растворителями. Ишикава и Миясака [348] применили для разделения этих соединений метод двустадийного элюирования смесями сначала ацетон—хлороформ (7:13), а затем гексан—этилацетат (7:13).

Таблица 29 12

Величины  $R_f \times 100$  некоторых буфогенинов, полученные на активированных при 100°C слоях силикагеля [346]<sup>a</sup>

Буфогенин	Этилацетат	Этилацетат — циклогексан (4 1)	Этилацетат — ацетон (9 1)	Этилацетат, насыщенный водой
Резибуфогенин	61	61 <sup>б</sup>	60	66
Буфалин	62	61	64	62
Буфоталинин	31	22	39	34
Маринобуфогенин	43 <sup>б</sup>	33 <sup>б</sup>	47	50
Гамабуфоталин	31	26	37	47
Телоцинобуфоген	34	23	28	37
Геллебригенин	28	18	25	30
Геллебригенол	9	7	17	23

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co

<sup>б</sup> Среднее двух определений.

Комацу и Окано [349] предпочитают анализировать эти стероиды на оксиде алюминия, активированном 120-минутным нагреванием при 180°C, используя смеси ацетон—хлороформ—циклогексан (3:3:4) или этилацетат—диэтиловый эфир (1:1). Эти авторы применяют как однократное, так и двукратное элюирование.

## 9. ПРОЧИЕ РАБОТЫ ПО СТЕРОИДАМ

Голаб и Лайне [350] исследовали хроматографические характеристики тридцати восьми 19-норстероидов. В работе этих авторов приведена таблица величин  $R_f$ , полученных со смесями этилацетат—циклогексан (1:1 и 3:7), а также указаны цветные реакции с трихлоридом сурьмы.

Тонкослойной хроматографии стероидов посвящен ряд обзоров, в том числе обзоры Негера [351, 352], Бейлевельда [353], Казуно и Хошиты [354] и Лисбоа [355—357].

Ривлин и Уилсон [358], а также Ричардсон и др. [359] использовали ТСХ на силикагеле для извлечения меченых стероидов из сцинтиллирующих смесей. Этот метод позволяет использовать радиоактивные препараты повторно.

Метц [360] изучал методом ТСХ ферментативные превращения стероидов. Он применил эффективный метод концентрирования разбавленных растворов перед нанесением их на тонкие слои. Этот метод заключается в следующем. Пробу наносят на короткий кусочек фильтровальной бумаги, который имеет форму узкого треугольника. Основание этого треугольника погружают в ацетон, и пятно стероида или другого соединения перемещается вместе с растворителем к узкой вершине треугольника. Далее бумагу вынимают из растворителя, сушат и повторяют всю процедуру до тех пор, пока в вершине бумажного треугольника не сконцентрируется требуемое количество вещества. После этого кончик бумаги помещают на тонкослойную пластинку и постепенно элюируют с него исследуемое вещество ацетоном.

Данненберг и др. [361—363] очищали с помощью ТСХ продукты дегидрогенизации стероидов.

Стевенс [364] испытал три обнаруживающих реактива, которые пригодны для обнаружения почти всех соединений, получаемых при синтезе кортикостероидов из сапогенинов, а также при синтезе промежуточных соединений С-21 и С-22. Эти реактивы: 1) свежеприготовленная смесь (1:10) 1%-ного раствора хлорида 2,5-дифенил-3-(4-стирилфенил)тетразолия в метаноле и 3%-ного раствора гидроксида натрия; 2) реактив Комаровского: смесь (1:10) 50%-ной (объем/объем) серной кислоты и 2%-ного раствора *n*-оксибензальдегида в метаноле (после опрыскивания хроматограмму нагревают 10 мин при 60°C); 3) 30%-ный раствор технического (technical) хлорида цинка в химически чистом (reagent grade) метаноле (после опрыскивания профильтрованным раствором надо в течение часа нагревать пластинку при 105°C и сразу после этого накрыть второй пластинкой, чтобы исключить контакт с атмосферной влагой). После завершения реакции с хлоридом цинка пластинку изучают в УФ-свете с длиной волны 366 нм. Вместо обычно используемого синего тетразолиевого рекомендуется стирилфенильное производное, так как это соединение дает более интенсивную окраску. Изучено влияние положения различных групп в молекулах на эффективность обнаружений реактивом Комаровского и реактивом на основе хлорида цинка.

Хенель и Муслим [365] опубликовали специальные таблицы, помогающие идентифицировать конъюгаты стероидов. Биелла

Суза Валле и Мартинс Оливера-Филго [366], чтобы облегчить идентификацию стероидов, проводили непосредственно на пластинках гистохимическую реакцию Хадлера, используя ее модифицированный вариант.

Пинелли и Форmento [367] разработали метод анализа субмикrogramмовых количеств стероидов в маленьких пробах мочи, объединив тонкослойную и газовую хроматографию. Чтобы получить свободные стероиды, эти авторы проводили ферментативный и химический гидролиз, после чего разделяли стероиды на силикагеле смеси диэтиловый эфир—метанол (1:1). Для количественного определения методом газовой хроматографии они использовали триметилсилиловые эфиры. Вайденхейвель [368] показал, что для ферментативного гидролиза нужны высокие концентрации ферментов.

Хара и Мибе [369] хроматографировали 23 синтетических гормональных стероида на силикагеле и оксиде алюминия смесью бензол—ацетон (4:1). Они привели величины  $R_f$  и  $\Delta R_m$ , а также цветные реакции с тремя обнаруживающими реактивами.

Лисбоа [370] разделял и идентифицировал стероиды методом, сочетающим ТСХ, газовую хроматографию и масс-спектрометрию. Он привел ряд примеров, показывающих, что эти методы дополняют друг друга. Курциус и Мюллер [371] использовали для анализа стероидов газохроматографический и тонкослойнохроматографический методы. После разделения стероидов в виде триметилсилиловых эфиров посредством газовой хроматографии эти эфиры осадили на слоях силикагеля, а затем гидролизировали *in situ* опрыскиванием 1%-ным раствором соляной кислоты в метаноле. После этого проводили элюирование смесью метилхлорида и ацетона (7:1) или хлороформа и этанола (9:1).

Хаммен и Мартен [372] для облегчения идентификации стероидов также использовали реакции *in situ* на тонких слоях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Avigan J., Goodman D. S., Steinbegr D., J. Lipid Res., 4, 100, (1963).
2. Claude J. R., J. Chromatogr., 17, 596 (1965).
3. Lees T. M., Lynch M. J., Mosher F. R., J. Chromatogr., 18, 595 (1965).
4. Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W., J. Chromatogr., 9, 316 (1962).
5. Kaufmann H. P., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 81 (1962).
6. Kaufmann H. P., Makus Z., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 1 (1962).
7. Kaufmann H. P., Wessels H., Das B., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 723 (1962).
8. Ikan R., Harel S., Kashman J., Bergmann E. D., J. Chromatogr., 14, 504 (1964).
9. Ikan R., Cudzinovski M. J. Chromatogr., 18, 422 (1965).
10. Idler D. R., Wiseman P., Int. J. Biochem., 2, 91 (1971).

11. Cargill D. I., Analyst, 87, 865 (1962).
12. Wientjens W. H. J. M., De Zeeuw R. A., Wijsbeek J., J. Lipid Res., 11, 376 (1970).
13. Kartnig T., Mikula G., J. Chromatogr., 53, 537 (1970).
14. Nicolaidis N., J. Chromatogr. Sci., 8, 717 (1970).
15. Barbier M., Jaeger H., Tobias H., Wyss E., Helv. Chim. Acta, 42, 2440 (1959).
16. Azarnoff D. L., Tucker D. R., Biochim. Biophys. Acta, 70, 589 (1963).
17. Smith L. L., Matthews W. S., Price J. C., Bachmann R. C., Reynolds B., J. Chromatogr., 27, 187 (1967).
18. Van Lier J. E., Smith L. L., J. Chromatogr., 41, 37 (1969).
19. Neuwald F., Fetting K. E., Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg., 108, 1490 (1963).
20. Acker L., Greve H., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 1009 (1963).
21. Horvath C., J. Chromatogr., 22, 52 (1966).
22. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 9, 359 (1962).
23. Van Dam M. J. D., Bull. Soc. Chim. Belg., 70, 122 (1961).
24. Zoellner N., Z. Klin. Chem., 1, 18 (1963).
25. Zoellner N., Kirsch K., Amin G., Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 66, 677 (1960).
26. Weicker H., Klin. Wochenschr., 37, 763 (1959).
27. Beukers H., Veltkamp W. A., Hooghwinkel G. J. M., Clin. Chim. Acta, 25, 403 (1969).
28. Claude J. R., Beaumont J. L., Ann. Biol. Clin. (Paris), 22, 815 (1964).
29. Herz J. E., González E., J. Chromatogr., 34, 251 (1968).
30. Johnson D. F., Bennett R. D., Heftmann E., Science, 140, 198 (1963).
31. Copius-Peereboom J. W., "Chromatographic Sterol Analysis", Pudoc, Wageningen, 1963.
32. Gad A. M., El Dakhakhny H., Hassan M. M., Planta Med., 11, 134 (1963).
33. Kiribuchi T., Chen C. S., Funahashi S., Agric. Biol. Chem., 29, 265 (1965).
34. Nagasampagi B. A., Rowe J. W., Simpson R., Goad L. J., Phytochemistry, 10, 1101 (1971).
35. Gawienowski A. M., Gibbs C. C., Steroids, 12, 545 (1968).
36. Wolff J. P., Karleskind A., Audiau F., Double-Liaison, 1966, 1529.
37. Gilbert J. D., Harland W. A., Steel G., Brooks C. J. W., Biochim. Biophys. Acta, 187, 453 (1969).
38. Ditullio N. W., Jacobs C. S., Jr., Holmes W. L., J. Chromatogr., 20, 354 (1965).
39. Kammereck R., Lee W.-H., Paliokas A., Schroepfer G. J. Jr., J. Lipid Res., 8, 282 (1967).
40. Wolfman L., Sachs B. A., J. Lipid Res., 5, 127 (1964).
41. Seher A., Homberg E., Fette, Seifen, Anstrichm., 73, 577 (1971).
42. Fabriani G., Getreide Mehl, 12, 109 (1962).
43. Schreiber K., Osske G., Experientia, 19, 69 (1963).
44. Schreiber K., Osske G., Sembdner G., Experientia, 17, 463 (1961).
45. Lavie D., Kaye I. A., J. Chem. Soc., 1963, 5001.
46. Ikan R., Kashman J., Israel J. Chem., 1, 502 (1963).
47. Wenzel M., Schulze P.-H., Wollenberg H., Naturwissenschaften, 49, 515 (1962).
48. Wiltzbach K. E., J. Am. Chem. Soc., 79, 1013 (1957).
49. Wenzel M., Schulze P.-H., "Tritium-Marketing", W. de Gruyter, Berlin, 1962.
50. Richter E., J. Chromatogr., 18, 164 (1965).
51. Mahadevan V., Lundberg W. O., J. Lipid Res., 3, 106 (1962).
52. Kaufmann H. P., Makus Z., Deicke F., Fette, Seifen Anstrichm., 63, 235 (1961).
53. Bergmann E. A., Ikan R., Harel S., J. Chromatogr., 15, 204 (1964).
54. Pelick N., Henly R. S., Sweeny R. F., Miller M., J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 419 (1963).



55. Van Dam M. J. D., De Kleuver G. J., de Heus J. G., J. Chromatogr., 4, 26 (1960).
56. Michalec C., Sulc M., Měšťan J., Nature, 193, 63 (1962).
57. Copius-Peereboom J. W., "The Analysis of Mixtures of Animal and Vegetable Fats; IV. Separation of Sterol Acetates by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 197.
58. Copius-Peereboom J. W., Beecker H. W., J. Chromatogr., 17, 99 (1965).
59. Copius-Peereboom J. W., Z. Anal. Chem., 205, 325 (1964).
60. Capella P., Fedeli E., Cirimele M., Lanzani A., Jacini G., Riv. Ital. Sostanze Grasse, 40, 645 (1963); Chem. Abstr., 61, 4971 (1964).
61. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 12, 245 (1963).
62. Lees T. M., Lynch M. J., Mosher F. R., J. Chromatogr., 18, 595 (1965).
63. Seher A., Homberg E., Fette, Seifen, Anstrichm., 70, 481 (1968).
64. Vroman H. E., Cohen C. F., J. Lipid Res., 8, 150 (1967).
65. Copius-Peereboom J. W., "Separation of Sterols on Silver Nitrate Impregnated Adsorbent Layers", in "Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography", K. Macek, I. M. Hais, Eds., Proc. Symp. 2nd, 1964, Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 316.
66. Morris L. J., J. Lipid Res., 4, 357 (1963).
67. Haahiti E., Nikkari T., Acta Chem. Scand., 17, 536 (1963).
68. Haahiti E., Nikkari T., Juva K., Acta Chem. Scand., 17, 538 (1963).
69. Horlich L., Avigan J., J. Lipid Res., 4, 160 (1963).
70. Purdy S. J., Truter E. V., Analyst (London), 87, 802 (1962).
71. Zoellner N., Wolfram G., Klin. Wochenschr., 40, 1098 (1962).
72. Zoellner N., Wolfram G., Amin G., Klin. Wochenschr., 40, 273 (1962).
73. Zak B., Dickenman R. C., White E. G., Burnett H., Cherney P. J., Am. J. Clin. Path., 24, 1307 (1954).
74. Kaufmann H. P., Viswanathan C. V., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 839 (1963).
75. Zlatkis A., Zak B., Boyle A. T., Lab. J., Clin. Med. 41, 486 (1953).
76. Quaije M. L., Geyer R. P., Bolliger H. R., Anal. Chem., 31, 950 (1959).
77. Vahouny G. V., Borja C. R., Weersing S., Anal. Biochem., 6, 555 (1963).
78. Ксенофонтова Е. В., Мухина М. В., Халецкий А. М., Журн. Общ. хим., 39, 913 (1969).
79. Samuel P., Urivetzky M., Kaley G., J. Chromatogr., 14, 508 (1964).
80. Nambara T., Imai R., Sakurai S., Yakagaku Zasshi, 84, 680 (1964).
81. Ivanov St. A., Bicheva P. I., Kopova B. T., Rev. Fr. Corps. Gras., 19, 177 (1972).
82. Bondjers G., Bjoerkerud S., Anal. Biochem., 42, 363 (1971).
83. Brandt R. D., Benviste P., Biochim. Biophys. Acta, 282, 85 (1972).
84. Parodi P. W., Australian J. Dairy Technol., 22, 209 (1967).
85. Thorpe C. W., Pohland L., Firestone D., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 774 (1969).
86. Thorpe C. W., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 778 (1969).
87. Rohmer M., Brandt R. D., Eur. J. Biochem., 36, 446 (1973).
88. Lisboa B. P., Diczfalusy E., Acta Endocrinol., 40, 60 (1962).
89. Boute J., Ann. Endocrinol. (Paris), 14, 518 (1953).
90. Kaegi H., Miescher K., Helv. Chim. Acta, 22, 683 (1938).
91. Breuer H., Knuppen R., Pongels G., Nature, 190, 720 (1961).
92. Lisboa B. P., Clin. Chim. Acta, 13, 179 (1966).
93. Lisboa B. P., Diczfalusy E., Acta Endocrinol., 43, 545 (1963).
94. Барбе М., Завьялов С. И., Изв. АН СССР, Отд. хим. наук, 1960, 1309.
95. Diamanstein T., Loercher K., Z. Anal. Chem., 191, 429 (1962).
96. Hertelendy F., Common P. H., Steroids, 2, 135 (1963).
97. Hertelendy F., Common R. H., J. Chromatogr., 13, 570 (1964).
98. Fokkens J., Polderman J., Pharm. Weekbl., 96, 657 (1961); Chem. Abstr., 55, 26371 (1961).
99. Kushinsky S., J. Chromatogr., 71, 161 (1972).
100. Coyotupa J., Kinoshita K., Ho R. Y., Chan C., Paul W., Foote M., Kushinsky S., Anal. Biochem., 34, 71 (1970).
101. Doerr P., J. Chromatogr., 59, 452 (1971).
102. Gelbke H. P., Knuppen R., J. Chromatogr., 71, 465 (1972).
103. Lisboa B. P., Methods Enzymol., 15, 154 (1969).
104. Frankel A. I., Nalbandov A. V., Steroids, 8, 749 (1966).
105. Krol G. J., Boyden G. R., Moody R. H., Comeau J. C., Kho B. T., J. Chromatogr., 61, 187 (1971).
106. Crocker L. E., Lodge B. A., J. Chromatogr., 62, 158 (1971).
107. Ibid., 69, 419 (1972).
- 107a. Abdel-Aziz M. T., Williams K. I. H., Steroids, 12, 167 (1968).
108. Petrović J. A., Petrović S. M., J. Chromatogr., 119, 625 (1976).
109. Touchstone J. C., Murawec T., Brual O., J. Chromatogr., 37, 359 (1968).
110. Follow K., Sinnecker R., Follow B., J. Chromatogr., 90, 402 (1974).
111. Cavina G., Moretti G., Petrella M., J. Chromatogr., 103, 368 (1975).
112. Taylor T., J. Chromatogr., 66, 177 (1972).
113. Luisi M., Savi C., Marescotti V., J. Chromatogr., 15, 428 (1964).
114. Smith L. L., Foell T., J. Chromatogr., 9, 339 (1962).
115. Stárka L., J. Chromatogr., 17, 599 (1965).
116. Penzes L. P., Oertel G. W., J. Chromatogr., 51, 322 (1970).
117. Oertel G. W., Penzes L. P., Z. Anal. Chem., 252, 306 (1970).
118. Dvir R., Chayen R., J. Chromatogr., 45, 76 (1969).
119. Touchstone J. C., Balin A. K., Knapstein P., Steroids, 13, 199 (1969).
120. Lisboa B. P., J. Chromatogr., 25, D16 (1966).
121. Struck H., Microchim. Acta, 1961, 634.
122. Schroeder I., López-Sánchez G., Medina-Acevedo J. C., del Carmen Espinosa M., J. Chromatogr. Sci., 13, 37 (1975).
123. Livingston A. L., Bickoff E. M., Guggolz J., Thompson C. R., J. Agric. Food Chem., 9, 135 (1961).
124. Bickoff E. M., Lyman R. L., Livingston A. L., Booth A. N., J. Am. Chem. Soc., 80, 3969 (1958).
125. Lyman R. L., Bickoff E. M., Booth A. N., Livingston A. L., Arch. Biochem. Biophys., 80, 61 (1959).
126. Luisi M., Ric. Sci. Rend., 3, 369 (1963); Chem. Abstr., 60, 16154 (1964).
127. Luisi M., Savi C., Coli F., Marescotti V., Folia Endocrinol. (Pisa), 15, 672 (1962).
128. Marescotti V., Luisi M., Savi C., Marcezzi A., Folia Endocrinol. (Pisa), 14, 848 (1961).
129. Jung L., Bourgoin Ch., Foussard J. C., Audrin P., Morand P., Rev. Fr. Etudes Clin. Biol., 8, 406 (1963).
130. Gaenshirt H. G., Polderman J., J. Chromatogr., 16, 510 (1964).
131. Wotiz H. H., Chatteraj S. G., Anal. Chem., 36, 1466 (1964).
132. Brown J. B., Biochem. J., 60, 185 (1955).
133. Knuppen R., Rao M. L., Breuer H., Z. Anal. Chem., 243, 263 (1969).
134. Kushinsky S., Coyotupa J., Honda K., Hiroi M., Kinoshita K., Foote M., Chan C., Ho R. Y., Paul W., Dignam W. J., Microchim. Acta, 1970, 491.
135. Moretti G., Cavina G., Sardi de Valverde J., J. Chromatogr., 40, 410 (1969).
136. Touchstone J. C., Murawec T., Brual O., Breckwoldt M., Steroids, 17, 285 (1971).
137. Wortmann W., Wortmann B., Schnabel C., Touchstone J. C., J. Chromatogr. Sci., 12, 377 (1974).
138. Touchstone J. C., Murawec T., Kasparow M., Balin A. K., J. Chromatogr. Sci., 8, 81 (1970).

139. *Touchstone J. C., Balin A. K., Murawec T., Kasparow M.*, J. Chromatogr., Sci., 8, 443 (1970).
140. *Penzes L. P., Oertel G. W.*, J. Chromatogr., 74, 359 (1972).
141. *Jacobsohn G. M.*, Anal. Chem., 36, 275 (1964).
142. *Ibid.*, p. 2030.
143. *Dyer W. G., Gould J. P., Maistrellis N. A., Peng T.-C., Ofner P.*, Steroids, 1, 271 (1963).
144. *Stárka L., Hampl R.*, J. Chromatogr., 12, 347 (1963).
145. *Stárka L., Sulcova J., Riedlova J., Adamec O.*, Clin. Chim. Acta, 9, 168 (1964).
146. *Change E.*, Steroids, 4, 237 (1964).
147. *Sonanini D., Anker L.*, Pharm. Acta Helv., 42, 54 (1967).
148. *James K. C., Richards G. T., Turner T. D.*, J. Chromatogr., 69, 141 (1972).
149. *Vaedtke J., Gajewska A.*, J. Chromatogr., 9, 345 (1962).
150. *Watson D. J., Bartosik D.*, J. Chromatogr., 54, 91 (1971).
151. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 13, 391 (1964).
152. *Cohn G. L., Pancake E.*, Nature, 201, 75 (1964).
153. *Ахрем А. А., Кузнецова А. И.*, Докл. АН СССР, 138, 591 (1961).
154. *Hara A., Takeuchi M.*, Endocrinol. Japan, 10, 202 (1963).
155. *Neher R., Wettstein A.*, Helv. Chim. Acta, 43, 1628 (1960).
156. *Menzel P., Oertel G. W.*, Arzneim. Forsch., 21, 1034 (1971).
157. *Schwarz V.*, Pharmazie, 18, 122 (1963).
158. *Doenges K., Staib W.*, J. Chromatogr., 8, 25 (1962).
159. *Reisert P. M., Schumacher D.*, 19, 84 (1963).
160. *Chamberlain J., Knights B. A., Thomas G. H.*, J. Endocrinol., 26, 367 (1963).
161. *Černý V., Joska J., Lábler L.*, Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 1658 (1961).
162. *Heřmánek S., Schwarz V., Čekan Z.*, Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 1669 (1961).
163. *Gower D. B.*, J. Chromatogr., 14, 424 (1964).
164. *Wright R. S.*, J. Chromatogr., 37, 363 (1968).
165. *Remmers V., Schmitt H., Solbach H. G., Staib W., Zimmermann H.*, J. Chromatogr., 32, 760 (1968).
166. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 19, 333 (1965).
167. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 19, 81 (1965).
168. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 13, 391 (1964).
169. *Lisboa B. P., Breuer H.*, Gen. Comp. Endocrinol., 6, 114 (1966).
170. *Lisboa B. P., Hoffmann U.*, J. Chromatogr., 115, 177 (1975).
171. *Treiber L., Oertel G. W.*, Z. Klin. Chem., 5, 83 (1967).
172. *Starnes W. R., Rhodes A. H., Lindsay R. H.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 26, 1245 (1966).
173. *Penzes L., Menzel P., Oertel G. W.*, J. Chromatogr., 44, 189 (1969).
174. *Hakl J.*, J. Chromatogr., 61, 183 (1971).
175. *Ibid.*, 71, 319 (1972).
176. *Gondos G., Matkovic B., Kovacz O.*, Microchem. J., 8, 415 (1964).
177. *Matkovic B., Teguey Z., Gondos G.*, Microchem. J., 11, 548 (1966).
178. *Dray F., Weliky I.*, Anal. Biochem., 34, 387 (1970).
179. *Cerrí O., Majfi G.*, Boll. Chim. Farm., 100, 954 (1961).
180. *Crépy O., Judas O., Lachese B.*, J. Chromatogr., 16, 340 (1964).
181. *Oertel G. W., Tornero M. C., Groot K.*, J. Chromatogr., 14, 509 (1964).
182. *Segura R., Oro J., Zlatkis A.*, J. Chromatogr. Sci., 8, 449 (1970).
183. *Panicucci F., Savi C., Coli F., Luisi M.*, Folia Endocrinol. (Pisa), 17, 237 (1964).
184. *Vermuelen A., Verplancke J. C. M.*, Steroids, 2, 453 (1963).
185. *Cavina G., Giocoli G., Sardini D.*, Steroids, 14, 315 (1969).
186. *Schulze P.-E., Wenzel M.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1, 580 (1962).

187. *Riondel A., Tait J. F., Gut M., Tait S. A. S., Joachim E., Little B.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 23, 620 (1963).
188. *Sparagana M.*, J. Nucl. Med., 12, 253 (1971).
189. *Bardin C. W., Lipsett M. B.*, Steroids, 9, 71 (1967).
190. *Guerra-Garcia R., Chatteraj S. C., Gaprilvoe L. J., Wolitz H. H.*, Steroids, 2, 605 (1963).
191. *Luisi M., Fassorra C., Levanti C., Franchi F.*, J. Chromatogr., 58, 213 (1971).
192. *Exley D.*, Biochem. J., 107, 285 (1968).
193. *Mougey E. H., Collins D. R., Rose R. M., Mason J. W.*, Anal. Biochem., 27, 343 (1969).
194. *Drosdowsky M. A., Populu N.-T.-T., Jayle M. F.*, Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1723 (1968).
195. *Fabre L. F., Jr. Fenimore D. C., Farmer R. W., Davis H. W., Farrell G.*, J. Chromatogr. Sci., 7, 632 (1969).
196. *Kent J. R., Rawitch A. B.*, J. Chromatogr., 20, 614 (1965).
197. *Knapstein P., Treiber L., Touchstone J. C.*, Steroids, 11, 915 (1968).
198. *Knapstein P., Touchstone J. C.*, J. Chromatogr., 37, 83 (1968).
199. *Struck H., Karg H., Jork H.*, J. Chromatogr., 36, 74 (1968).
200. *Huck H.*, J. Chromatogr., 110, 125 (1975).
201. *Graef V.*, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 8, 320 (1970).
202. *Schwarz V.*, Collect. Czech. Chem. Commun., 27, 2567 (1962).
203. *Schwarz V., Syhora K.*, Collect. Czech. Chem. Commun., 28, 101 (1963).
204. *Cavina G., Vicari C.*, "Qualitative and Quantitative Analysis of Natural and Synthetic Corticosteroids by Thin-Layer Chromatography", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 180.
205. Хроматография в тонких слоях, Пер. с нем./Под ред. Э. Шталя, М., 1965, гл. 13, стр. 249.
206. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 39, 173 (1969).
207. *Levin S. S., Touchstone J. C., Murawec T.*, J. Chromatogr., 42, 129 (1969).
208. *Stárka L., Maliková J.*, J. Endocrinol., 22, 215 (1961).
209. *Нгуен Б. Х., Чемерисская А. А.*, Журн. анал. хим., 21, 1375 (1966).
210. Там же, стр. 1123; Anal. Abstr., 15, 4166 (1968).
211. *Schwarz V.*, J. Chromatogr., 12, D6 (1963).
- 211a. *Schreiber J., Adam G.*, Monath. Chem., 92, 1093 (1961).
212. *Matis J., Adamec O., Galvánek M.*, Nature, 194, 477 (1962).
213. *Johannesen B., Sandal A.*, Medd. Norsk Farm. Selsk., 23, 105 (1961).
214. *Tschesche R., Snatzke G.*, Ann. Chem., 636, 105 (1960).
215. *Vaedtke J., Gajewska A.*, J. Chromatogr., 9, 345 (1962).
216. *Yawata M., Zimm E. M.*, Steroids, 3, 435 (1964).
217. *Goedel L., Goldermann W., Lommer D.*, Z. Physiol. Chem., 333, 35 (1963).
218. *Butruk E., Vaedtke J.*, J. Chromatogr., 32, 311 (1968).
219. *Quesenberry R. O., Unger F.*, Anal. Biochem., 8, 192 (1964).
220. *Korzun B. P., Brody S.*, J. Pharm. Sci., 52, 206 (1963).
221. *Lábler L., Sorm F.*, Collect. Czech. Chem. Commun., 27, 276 (1962).
222. *Scheiffarth F., Zicha L.*, Acta Endocrinol. Suppl., 67, 93 (1962).
223. *Scheiffarth F., Zicha L., Funck F.-W., Engelhardt M.*, Acta Endocrinol., 43, 227 (1963).
224. *Zicha L., Scheiffarth F., Bergner D., Engelhardt M.*, Acta Endocrinol. Suppl., 57, 94 (1962).
225. *Bernauer W., Schmidt L.*, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 245, 11 (1963).
226. *Ibid.*, 243, 311 (1962).
227. *Bernauer W., Schmidt L., Ullman G.*, Med. Exp., 9, 191 (1963).
228. *Schmidt L., Bernauer W.*, Klin. Wochenschr., 40, 918 (1962).
229. *Schmidt L., Bernauer W.*, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 245, 112 (1963).
230. *Pasqualini J. R., Jayle M. F.*, Experientia, 18, 273 (1962).

231. *Aувинен Э. М., Фаворская И. А.*, Вестн. МГУ, сер. физ., хим., № 10, 122 (1963).
232. *Watson D. J., Romanoff E. B.*, J. Chromatogr., 22, 192 (1966).
233. *Takeuchi M.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 11, 1183 (1963); Chem. Abstr., 59, 15558 (1963).
234. *Lisboa B. P.*, Acta Endocrinol., 43, 47 (1963).
235. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., 16, 136 (1964).
236. *Lisboa B. P.*, Steroids, 8, 319 (1966).
237. *Stevens P. J.*, J. Chromatogr., 36, 253 (1968).
238. *Frgaić S., Kniewald Z.*, J. Chromatogr., 94, 291 (1974).
239. *Taylor T.*, Anal. Biochem., 41, 435 (1971).
240. *Moreno Delmau J., Plá Delfina J. M., del Poso Ojeda A.*, J. Chromatogr., 48, 118 (1970).
241. *Moreno J., et al.*, J. Chromatogr., 78, 165 (1973).
242. *Bishara R. H.*, J. Chromatogr., 43, 539 (1969).
243. *Whitehouse M. W., Bresler A. E., Staple E.*, J. Chromatogr., 1, 385 (1958).
244. *Mattheus J. S.*, Biochem. Biophys. Acta, 69, 163 (1963).
245. *Vecsei P. (Weisz), Kemény V., Goergényi A.*, J. Chromatogr., 14, 506 (1964).
246. *Bernauer W.*, Klin. Wochenschr., 41, 883 (1963).
247. *Bernauer W., Schmidt L.*, Arch. Exp. Pathol., Pharmacol., 246, 68 (1963).
248. *Nishikaze O., Abraham R., Staudinger H. J.*, J. Biochem. (Tokyo), 54, 427 (1963).
249. *Nishikaze O., Staudinger H. J.*, Klin. Wochenschr., 40, 1014 (1962).
250. *Luisi M., Savi C., Coli F., Gambassi G., Panicucci F.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 39, 1267 (1963); Chem. Abstr., 60, 5838 (1964).
251. *Luisi M., Savi S., Coli F., Panicucci F., Maescotti V.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 39, 1264 (1963).
252. *Adamec O., Matis J., Galvanek M.*, Steroids, 1, 495 (1963).
253. *Porter C. C., Silber R. H.*, J. Biol. Chem., 185, 201 (1950).
254. *Bird H. L., Brickley H. F., Comer J. P., Hartsaw P. E., Johnson M. L.*, Anal. Chem., 35, 346 (1963).
255. *Mattews J. S., Pereda-V. A. L., Aguilera-P. A.*, J. Chromatogr., 9, 331 (1962).
256. *Feher T., Feher G. K., Bodrogi L., Vertes K.*, Kiserl. Orvostud., 23, 327 (1971).
257. *Hara S., Tanaka H., Takeuchi M.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 12, 626 (1964).
258. *Molina-Andreu E., Masdeu S., Ras R. M., Aznar J. A.*, Rev. Espan. Fisiol., 28, 129 (1972).
259. *Белова Т. А., Шрейберг Г. Л., Эпштейн М. И.*, Лаб. дело, 1968, № 7, стр. 426.
260. *Uettwiller A., Keller M.*, J. Chromatogr., 35, 526 (1968).
261. *Hamman B. L., Martin M. M.*, J. Lab. Clin. Med., 73, 1042 (1969).
262. *Bruinvels J.*, Experientia, 19, 551 (1963).
263. *Few J. D., Forward T. J.*, J. Chromatogr., 36, 63 (1968).
264. *Futterweit W., McNiven M. L., Dorfman R. I.*, Biochim. Biophys. Acta, 71, 474 (1963).
265. *Collins W. P., Sommerville I. F.*, Nature, 203, 836 (1964).
266. *Brooks C. J. W., Watson J.*, J. Chromatogr., 31, 396 (1967).
267. *Waldi D., Munter F., Wolpert E.*, Med. Exp., 3, 45 (1960).
268. *Waldi D.*, Klin. Wochenschr., 40, 827 (1962).
269. *Waldi D.*, Lab. Sci., (Milan), 11, 81 (1963).
270. *Waldi D.*, Aerzil. Lab., 9, 221 (1963).
271. *Stárka R., Riedlova J.*, Endokrinologie, 43, 201 (1962).
272. *Bang H. O.*, J. Chromatogr., 14, 520 (1964).
273. *Lau H. L., Jones G. S.*, Am. J. Obstet. Gynecol., 90, 132 (1964).

274. *Kulenda Z., Horáková E.*, Z. Med. Labortechn., 4, 173 (1963).
275. *Fischer P.*, Schweiz. Apoth.-Ztg., 111, 703 (1973).
276. *Frosch B., Wagener H.*, Z. Klin. Chem., 1, 187 (1963).
277. *Wagener H., Frosch B.*, Klin. Wochenschr., 41, 1094 (1963).
278. *Gaenshirt H., Koss F. W., Morianz K.*, Arzneim.-Forsch., 10, 943 (1960).
279. *Kritchevsky D., Martak D. S., Rothblat G. H.*, Anal. Biochem., 5, 388 (1963).
280. *Eneroth P.*, J. Lipid Res., 4, 11 (1963).
281. *Hara S.*, Bunseki Kagaku, 12, 199 (1963).
282. *Hara S., Takeuchi M.*, Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo, 13, 75 (1963); Chem. Abstr., 61, 16417 (1964).
283. *Hara S., Takeuchi M.*, J. Chromatogr., 11, 563 (1963).
284. *Usui T.*, J. Biochem. (Tokyo), 54, 283 (1963); Chem. Abstr., 60, 16191 (1964).
285. *Koss F. W., Jerchel D.*, Naturwissenschaften, 51, 382 (1964).
286. *Hofmann A. F.*, J. Lipid Res., 3, 127 (1962).
287. *Hofmann A. F.*, "Thin-Layer Chromatography of Bile Acids and Their Derivatives", "New Biochemical Separations", A. T. James, L. J. Morris Eds., Van Nostrand, London, 1964, p. 261.
288. *Hofmann A. F.*, Acta Chem. Scand., 17, 173 (1963).
289. *Hofmann A. F.*, Anal. Biochem., 3, 145 (1962).
290. *Gruette F.-K., Gaertner H.*, J. Chromatogr., 41, 132 (1969).
291. *Spears R., Vukusich D., Mangat S., Reddy B. S.*, J. Chromatogr., 116, 184 (1976).
292. *Huang C. T. L., Nichols B. L.*, J. Chromatogr., 109, 427 (1975).
293. *Ikawa S., Goto M.*, J. Chromatogr., 114, 237 (1975).
294. *Begemann F.*, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 10, 29 (1972).
295. *Panveliwalla D., Lewis B., Wootton I. D. P., Tabaqchali S.*, J. Clin. Pathol., 23, 309 (1970).
296. *Freimuth U., Zawta B., Buechner M.*, J. Chromatogr., 30, 607 (1967).
297. *Anthony W. L., Beher W. T.*, J. Chromatogr., 13, 567 (1964).
298. *Sundaram G. S., Sodhi H. S.*, J. Chromatogr., 61, 370 (1971).
299. *Kritchevsky D., Martak D. S., Rothblat G. H.*, Anal. Biochem., 5, 388 (1963).
300. *Goswami S. K., Frey C. F.*, J. Chromatogr., 53, 389 (1970).
301. *Wollenweber J., Kottke B. A., Owen C. A., Jr.*, J. Chromatogr., 24, 99 (1966).
302. *Frosch B., Wagener H.*, Z. Klin. Chem., 2, 7 (1964).
303. *Frosch B., Wagener H.*, Klin. Wochenschr., 42, 192 (1964).
304. *Frosch B., Wagener H.*, Klin. Wochenschr., 901 (1964).
305. *Eastwood M. A., Hamilton D., Mowbray L.*, J. Chromatogr., 65, 407 (1972).
306. *Hara S., Takeuchi M., Tachibana M.*, G. Chihhara, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 12, 483 (1964).
307. *Semenuk G., Beher W. T.*, J. Chromatogr., 21, 27 (1966).
308. *Kim H. K., Kritchevsky D.*, J. Chromatogr., 117, 222 (1976).
309. *Cohen B. I., Raicht R. F., Salen G., Mosback E. H.*, Anal. Biochem., 64, 567 (1975).
310. *Tschesche R., Wulff G.*, Chem. Ber., 94, 2019 (1961).
311. *Tschesche R., Wulff G.*, G. Balle, Tetrahedron, 18, 959 (1962).
312. *Tschesche R., Wulff G.*, Tetrahedron, 19, 621 (1963).
313. *Takeda K., Hara S., Wada A., Matsumoto N.*, J. Chromatogr., 11, 562 (1963).
314. *Matsumoto N.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 11, 1189 (1963); Chem. Abstr., 59, 15559 (1963).
315. *Bennett R. D., Heftmann E.*, J. Chromatogr., 9, 353 (1962).
316. *Blunden G., Harman R.*, J. Chromatogr., 15, 273 (1964).
317. *Sander H., Hauser H., Haensel R.*, Planta Med., 9, 8 (1961).
318. *Sander H., Willuhn G.*, Flora, 151, 150 (1961).
319. *Sander H., Alkemeyer M., Haensel R.*, Arch. Pharm., 295, 6 (1962).

320. *Boll P. M.*, Acta Chem. Scand, **16**, 1819 (1962).  
 321. *Boll P. M., Andersen B.*, Planta Med., **10**, 421 (1962).  
 322. *Kuhn R., Loew I.*, Chem. Ber., **95**, 1748 (1962).  
 323. *Chiario I. B.*, Boll. Chim. Farm., **103**, 423 (1964).  
 324. *Schreiber K., Aurich O., Osske G.*, J. Chromatogr., **12**, 63 (1963).  
 325. *Dawider A. M., Fayez M. B. E.*, Z. Anal. Chem., **259**, 283 (1972).  
 326. *Held G., Vágújfalvi D.*, Herba Hung., **9**, 127 (1970).  
 327. *Мадаева О. С., Рыжкова В. К.*, Мед. промышл. СССР, **17**, № 1, стр. 44 (1963).  
 328. *Carreras Matas L.*, An. Real. Acad. Farm., **26**, 371 (1960).  
 329. *van Duuren A. J.*, J. Am. Soc. Sugar Beet Technol., **12**, 57 (1962).  
 330. *Хорлин А. Я., Оводов Ю. С., Кочетков Н. К.*, Журн. Общ. хим., **32**, 782 (1962); Chem. Abstr., **58**, 4636 (1963).  
 331. *Kawasaki T., Miyahara K.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **11**, 1546 (1963); Chem. Abstr., **60**, 11850 (1964).  
 332. *Wolf W. J., Thomas B. W.*, J. Chromatogr., **56**, 281 (1971).  
 333. *Pasich B.*, Planta Med., **11**, 16 (1963).  
 334. *Zak B.*, J. Am. Clin. Pathol., **27**, 583 (1967).  
 335. *Paquin R., Lepage M.*, J. Chromatogr., **12**, 57 (1963).  
 336. *Adam G., Schreiber K.*, Tetrahedron Lett., **1963**, 943.  
 337. *Adam G., Schreiber K.*, Z. Chem., **3**, 100 (1963).  
 338. *Schreiber K., Adam G.*, Ann. Chem., **666**, 155 (1963).  
 339. *Ibid.*, p. 176.  
 340. *Schreiber K., Roensch H.*, Tetrahedron Lett., **1963**, 329.  
 341. *Bite P., Jókay L., Pongfacs-Sterk L.*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **34**, 363 (1962).  
 342. *Lábler L., Černý V.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **28**, 2932 (1963).  
 343. *Lábler L., Černý V.*, "Thin-Layer Chromatography of Steroidal Bases and Holarrhena Alkaloids", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 144.  
 344. *Kasal A., Poláková A., Kamernitzky A. V., Lábler L., Černý V.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **28**, 1189 (1963).  
 345. *Zeitler H.-J.*, J. Chromatogr., **18**, 180 (1965).  
 346. *Zelnik R., Ziti L. M.*, J. Chromatogr., **9**, 371 (1962).  
 347. *Zelnik R., Ziti L. M., Guimaraes C. V.*, J. Chromatogr., **15**, 9 (1964).  
 348. *Ishikawa M., Miyasaka T.*, Shika Zairyo Kenkyusho Hokoku, **2**, 397 (1962); Chem. Abstr., **58**, 11483 (1963).  
 349. *Komatsu M., Okano S.*, Bunseki Kagaku, **15**, 1115 (1966).  
 350. *Golab T., Layne D. S.*, J. Chromatogr., **9**, 321 (1962).  
 351. *Neher R.*, "Thin-Layer Chromatography of Steroids", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 75.  
 352. *Neher R.*, "Steroid Separation and Analysis", in "Advances in Chromatography", Vol. 4, J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1967, p. 47.  
 353. *Beijleveld W. M.*, Pharm. Weekbl., **97**, 190 (1962).  
 354. *Kazuno T., Hoshita T.*, Seikagaku, **34**, 139 (1962); Chem. Abstr., **57**, 4962 (1962).  
 355. *Lisboa B. P.*, "Thin-Layer Chromatography of Sterols and Steroids", in "Lipid Chromatographic Analysis", 2nd Ed., G. V. Marinetti, Ed., Marcel Dekker, New York, 1976, p. 339.  
 356. *Lisboa B. P.*, "Steroids", in "Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography", K. Macek, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 275.  
 357. *Lisboa B. P.*, "Thin-Layer Chromatography of Steroids, Sterols and Related Compounds", in "Methods of Enzymology", Vol. XV, S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York, 1968, p. 3.  
 358. *Rivlin R. S., Wilson H.*, Anal. Biochem., **5**, 267 (1963).

359. *Richardson G. S., Weliky I., Batchelder W., Griffith M., Engel L. L.*, J. Chromatogr., **12**, 115 (1963).  
 360. *Metz H.*, Naturwissenschaften, **48**, 569 (1961).  
 361. *Dannenberg H., Hebenbrock K. F.*, Ann. Chem., **662**, 21 (1963).  
 362. *Dannenberg H., Neumann H.-G.*, Chem. Ber., **94**, 3085 (1961).  
 363. *Ibid.*, p. 3094.  
 364. *Stevens P. J.*, J. Chromatogr., **14**, 269 (1964).  
 365. *Haehnel R., Muslim N. B.*, Chromatogr. Rev., **11**, 215 (1969).  
 366. *Biella Souza Valle L., Martins Oliveira-Filho R.*, J. Chromatogr., **105**, 201 (1975).  
 367. *Pinelli A., Formento M. L.*, J. Chromatogr., **68**, 67 (1972).  
 368. *Vandenhuevel F. A.*, Can. J. Biochem., **45**, 191 (1967).  
 369. *Hara S., Mibe K.*, Anal. Chem., **40**, 1605 (1968).  
 370. *Lisboa B. P.*, J. Chromatogr., **48**, 364 (1970).  
 371. *Curtius H.-C., Mueller M.*, J. Chromatogr., **32**, 222 (1968).  
 372. *Hamman B. L., Martin M. M.*, Steroids, **10**, 169 (1967).

Таблица 30.1

Величины  $R_f \times 100$  некоторых терпенов и сесквитерпенов, полученные на кремневой кислоте с различными растворителями. Длина пути элюирования 10 см [1]<sup>a</sup>

Соединение	Гексан	2,2-Диметилбутан	Циклогексан	Метилциклогексан	Изопентан
Лимонен	41	55	54	59	74
Терпинолен	64	67	60	65	89
$\alpha$ -Пинен	83	85	84	90	80
Камфен	84	76	79	80	79
<i>n</i> -Цимол	38	41	62	69	57
Цедрен	82	80	83	85	78
$\alpha$ -Кариофиллен	50	35	47	33	27
$\beta$ -Кариофиллен	62	60	52	65	75
$\gamma$ -Кариофиллен	80	82	87	90	83
$\beta$ -Пинен	80	75	80	85	75

<sup>a</sup> С разрешения American Chemical Society.

### 1. УГЛЕВОДОРОДЫ

Терпеновые углеводороды достаточно хорошо разделяются на слоях кремневой кислоты [1]. Перед употреблением пластинки сушат 15 мин при 105°C и после этого выдерживают 30 мин в вакуум-эксикаторе, содержащем осушитель — гидроксид калия, при остаточном давлении 30 мм рт. ст. Следует избегать применения кислотных осушителей, например пентоксида фосфора, потому что пары кислот, адсорбированные кремневой кислотой, мешают последующему обнаружению флуоресцеином и парами брома. Поскольку углеводороды по своей природе малополярны, для их разделения следует использовать растворители также малой полярности. В табл. 30.1 даны величины  $R_f$  некоторых терпенов, полученные при хроматографировании с различными растворителями на полосках кремневой кислоты. Все соединения, за исключением *n*-цимола, обнаруживали опрыскиванием 0,05 %-ным водным раствором флуоресцеина с последующей обработкой парами брома. Эти соединения дают желтые пятна на розовом фоне. Если ввести в слой адсорбента флуоресцирующую добавку [2], то при облучении УФ-светом можно обнаружить *n*-цимол в виде темного пятна.

Дэвис и др. [3] хроматографировали углеводороды этой группы на силикагеле G с лигроином и получили следующие величины  $R_f$ : сквален 0,41, ликоперсен 0,30, фитоен 0,21 и фитофлуен 0,12. Эти углеводороды обнаруживают, обрабатывая хроматограммы парами йода; чувствительность определения при этом составляет 0,05 мкг. Используя как растворитель петролейный эфир, а как адсорбент оксид алюминия, Гроб и Боскетти [4] выделили из *Neurospora prassa* ликоперсен и сквален ( $R_f$  0,44 и 0,30 соответственно). Васквез и Янер [5] выделяли сквален из листьев маслин методом колоночной и тонкослойной хроматографии.

Фукуши и Обата [6] выделили азулен из синего камфорного масла, элюируя пробу петролейным эфиром на кремневой кислоте;  $R_f$  азулена в этой системе 0,76,  $R_f$  кадалена 0,88. Тетени и др. [7] исследовали азуленовые соединения, полученные из различных видов *Achillea*. Кирби [8] разделил на пропитанном щавелевой кислотой силикагеле несколько азуленов, используя

толуол как растворитель. Авторы работы [9] разделяли проазулены на слоях силикагеля смесью бензол—этилацетат (2:1). Тетени и др. [10], изучая азулены *Achillea*, использовали как хроматографию на бумаге, так и тонкослойную хроматографию.

Гупта и Дев [11] разделили несколько сесквитерпенов на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра (табл. 30.2). (Методы приготовления пропитанных гелей описаны в т. 1, гл. III, разд. 4 и 7). Они элюировали пробу в камере с насыщенной атмосферой, используя как растворители *n*-гексан и смесь бензол—ацетон (95:5). Обнаруживали разделенные соединения опрыскиванием пластинки смесью хлорсульфоновой и уксусной кислот (1:2) с последующим 10-минутным нагреванием при 130°C. Вестфельт [12], а также Чоу и др. [13] тоже анализировали сесквитерпены на таком же адсорбенте. Лоуренс [14] исследовал возможность разделения монотерпенов на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра при элюировании бензолом. Результаты его опытов приводят к трем следующим выводам: 1) циклические терпены с изолированной внутренней двойной связью в молекуле плохо образуют  $\pi$ -комплексы; 2) циклические или ациклические терпены, содержащие две неконцевые двойные связи в молекуле, плохо образуют  $\pi$ -комплексы,

Таблица 30.2

Величины  $R_{st}$  и  $R_A$  некоторых сесквитерпенов, полученные на силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра [11]<sup>a</sup>

Соединение	Бензол — ацетон (95 : 5)	<i>n</i> -Гексан
	$R_{st}$ <sup>b</sup>	$R_A$ <sup>b</sup>
Гумулен	0,189	
β-Элемен	0,331	
Кариофиллен	0,422	
β-Селинен	0,805	
β-Бисаболен	0,936	
Туйопсен	1,149	
Копаен	1,161	
Гимахален (аром.)	1,164	
α-Гурыюнен	1,168	
β-Гимахален		3,155
α-Гимахален		5,190
Лонгифолен		5,357
Купарен		5,391
Изолонгифолен		7,447
Лонгциклен		8,399

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

<sup>b</sup>  $R_{st} = R_f(\text{соединение})/R_f(\text{Судан III})$ .

<sup>c</sup>  $R_A = R_f(\text{соединение})/R_f(\text{азобензол})$ .

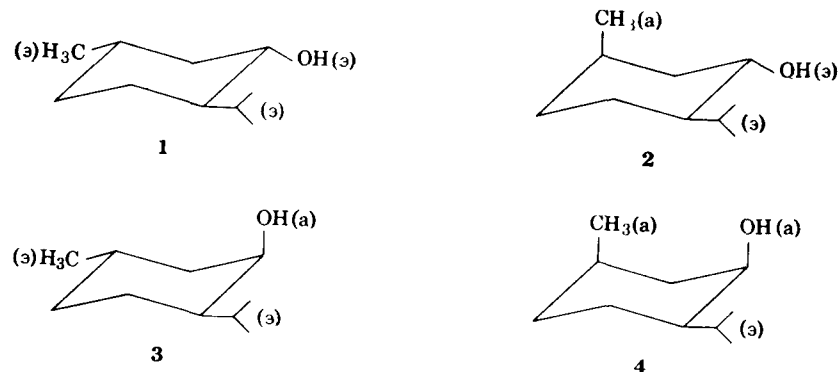
если только эти связи не являются *цис*-сопряженными; 3) циклические и ациклические терпены с экзоциклическими или концевыми двойными связями могут образовать π-комплексы.

Шанц и др. [15] привели величины  $R_f$  19 монотерпенов, разделенных на этом адсорбенте с применением бензола в качестве растворителя.

Аттавей и др. [16] указали величины  $R_f$  20 монотерпеновых, 11 сесквитерпеновых и нескольких политерпеновых углеводов, полученные на силикагеле и на оксиде алюминия с скеллизольвом В (смесь гексанов) в качестве элюирующего растворителя. Разделение сесквитерпеновых углеводов, как считают эти авторы, идет более эффективно на оксиде алюминия при элюировании смесью перфторалканов (70—80°C).

## 2. СПИРТЫ

Миллер и Кирхнер [1] исследовали разделение ряда терпеновых спиртов в 12 различных растворителях. Они хроматографировали эти спирты на слое кремневой кислоты с добавкой 5% связующего—крахмала. Обнаруживали пятна соединений флуоресцеин-бромным реактивом. В табл. 30.3 даны полученные ими величины  $R_f$ , а также величины  $R_f$ , взятые из работы других авторов, применявших различные разделяющие системы.



Ито [22] нашел, что стереоизомерные ментолы с аксиальной оксигруппой (соединения 3 и 4) можно отделить от соответствующих соединений с экваториальной оксигруппой (соединения 1 и 2) на слоях силикагеля, элюируя пробу смесью гексан—этилацетат (85 : 15). Таким образом можно отделить ментол (1) от неоментола (2), а также изоментол (3) от неизоментола (4). Петрович [23] разделил соединения этой группы, используя четыре различных растворителя (табл. 30.4). Граф и Хоппе [24] рассматривали стереохимию товарных ментолов. Чтобы выявить примесь неоментола в ментоле, они хроматографировали пробу на силикагеле, элюируя ее смесью бензол—этилацетат (95 : 5), а чтобы выделить примесь изоментола в ментоле, переводили спирты в 3,5-динитробензоаты, которые затем элюировали на 15 см смесью петролейный эфир (105—120°C)—изопропиловый эфир (95 : 5). После опрыскивания 0,04%-ным раствором флуоресцеина натрия эти производные можно различить по величинам  $R_f$ , разность этих величин равна 0,05.

Можно также окислить спирты до соответствующих производных метона, которые при хроматографировании смесью петролейный эфир (т. кип. 105—120°C)—этилацетат (95 : 5) и последующем обнаружении раствором 2,4-динитрофенилгидразина дают  $R_f$  с разностью около 0,1. Используют как растворитель смесь бутанол—этилацетат (1 : 4) и смесь ацетон—этилацетат

Величины  $R_f \times 100$  некоторых терпеновых спиртов

Спирт	Кремневая кислота + 5 % крахмала в качестве связующего <sup>a</sup> [1]											Силикагель G <sup>б</sup>				Оксид алюминия (активность II), незакаленные слои B [20]			
	A	B	B	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Н	О	П	Р	С	
	Нерол	26	38	42	30	30	28	54	38	36	27	0	14	15					
Цитронеллол	27	39	41	33	36	36	56	41	41	36	0	19	15						
Гераниол	20	40	43	34	29	29	55	31	30	25	0	12	15						
Линалоол	36	47	45	31	53	53	67	45	48	48	0	15	20						
$\alpha$ -Терпинеол	29	34	36	22	32	32	56	29	35	25	0	8	15		16	27	43		
Нопол	27	48	52	51	59	59	65	60	43	41	0	12	18						
Карвеол	34	44	49	38	40	40	60	51	45	29	0	12	20		10	17	32		
Борнеол													25		12	21	28		
Ментол	42 <sup>г</sup>											37 <sup>г</sup>					48		

<sup>a</sup> Растворители: А — 15 % этилацетата в гексане; Б — 10 % этилацетата в хлороформе (не содержащем спирта); В — 15 % этилацетата в бензоле; Г — 5 % этилацетата в хлороформе (не содержащем спирта); Д — 50 % 1-нитропропана в гексане; Е — 30 % этилацетата в гексане; Ж — 15 % этилкарбоната в хлороформе (не содержащем спирта); З — 30 % изопродиформиата в гексане; И — 50 % изопропилового эфира в гексане; К — гексан, Л — хлороформ (не содержащий спирта); длина пути элюирования 10 см

<sup>б</sup> Растворители: М — 5 % этилацетата в бензоле, длина пути элюирования 14 см [17, 18], Н — метилхлорид, длина пути элюирования 15 см [19].

в Растворители: О — 50 % бензола в петролейном эфире, П — бензол; Р — 2 % этанола в бензоле; С — 5 % этанола в бензоле

<sup>г</sup> По данным Ито и др [21]

Таблица 30.4

Величины  $R_f \times 100$  стереоизомеров ментола [23]<sup>a</sup>

Соединение	Бензол	Бензол — метанол (95 : 5)	Бензол — метанол (75 : 25)	Метанол
Ментол (1)	16	36	67	90
Неоментол (2)	28	51	73	85
Изоментол (3)	17	37	62	91
Неоизоментол (4)	29	55	76	80

<sup>a</sup> С разрешения автора и Verlag Chemie.

(3 : 7), Ямамото и Фурукава [25] разделяли на хроматографических полосках терпеновые *цис*- и *транс*-диолы.

Другим примером разделения стереоизомеров может служить работа Тиухака и др. [26], которые разделяли *транс, транс*-фарнезол и *цис, транс*-фарнезол на силикагеле, элюируя пробу на 16 см бензолом, содержащим 5 % этилацетата [1]. Соответствующие величины  $R_f$  равны 0,27 и 0,36. Эти авторы привели также величины  $R_f$  нескольких сложных эфиров ментолов. Мак-Суини [27] разделял на силикагеле стереоизомеры фарнезола, содержащиеся в товарном продукте, а также другие терпенолы, элюируя их смесью бензол—этилацетат (4 : 1). Кроме силикагеля, адсорбентом служил также кизельгур, пропитанный 5 %-ным раствором парафинового масла в петролейном эфире (40—60°C). Пластинку погружали в раствор масла. В последнем случае элюирование проводилось насыщенной парафиновым маслом смесью ацетон—вода (13 : 7) на расстоянии 15 см.

Бенторп и Тернбулл [28] хроматографировали на силикагеле изомерные туйолы 9 различными растворителями.

Мак-Суини [29] разделил 6 терпенолов методом хроматографии с обращенными фазами. Адсорбентом служил кизельгур, пропитанный парафином, а элюирующим растворителем насыщенная парафиновым маслом смесь ацетон—вода (65 : 35). Эти же соединения разделили также на силикагеле, элюируя смесью бензол—этилацетат (95 : 5). Данфи и др. [30] применили также распределительную хроматографию для разделения длинноцепных изопреноидных спиртов, полученных из различных источников. В этом случае также использовался пропитанный парафином кизельгур и 90 %-ный или чистый ацетон.

Терпеновые спирты анализировали также в виде их производных. Ацетаты дитерпеновых спиртов, полученных из растений

родов *Croton* и *Euphorbia* семейства *Euphorbiaceae*, хроматографировали с рядом растворителей на силикагеле и оксиде алюминия [31]. В некоторых случаях, чтобы повысить эффективность разделения, элюирование повторили несколько раз. Хедин и др. [32] получили сначала трихлорацетилизотиоцианаты терпеновых спиртов, а затем хроматографировали эти эфиры на силикагеле, элюируя 2-хлорпропаном. Их переводили также в соответствующие карбаматы, которые хроматографировали в таких же условиях. Тер-Хейде [33] хроматографировал 50 сложных эфиров (главным образом ацетатов) терпеновых моноспиртов на чистом силикагеле или силикагеле, пропитанном раствором нитрата серебра, используя как элюирующий растворитель смесь бензол—дихлорметан (2 : 8). 3,5-Динитробензоаты терпеновых спиртов разделяли на силикагеле со смесью бензол—петролейный эфир (38—50°C) [34—36] или на полиамиде со смесью метанол—вода (9 : 1) [34].

Икан [37] разделил на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле несколько тетрациклических тритерпеновых спиртов, которые не удается разделить на необработанном силикагеле, так как в последнем случае получаются почти тождественные величины  $R_f$ . На обработанном силикагеле при элюировании хлороформом на 15 см Икан получил следующие величины  $R_f$ : бутироспермол 0,40, циклоартенол 0,33, циклолауденол 0,26, эуфол 0,30,  $\alpha$ -эуфорбол 0,27 и паркеол 0,11. Копиус-Пеереboom [38] также разделял тритерпеноидные спирты на слоях силикагеля, пропитанного раствором нитрата серебра.

Кардемил и др. [39] разделяли некоторые изопреноидные спирты на пропитанном раствором нитрата серебра силикагеле, элюируя пробу этилацетатом. Пешнел [40] разделил на силикагеле, пропитанном нитратом серебра, гальбанол на булнезол, гвайол и  $\alpha$ -эудесмол; вначале предполагалось, что гальбанол—сесквитерпеновый спирт.

Зейкель и Рове [41] хроматографировали гвайол и три изомера эудесмола на слоях оксида алюминия смесью бензол—петролейный эфир (1 : 1), используя с целью достижения удовлетворительного разделения этих соединений метод непрерывной нисходящей хроматографии.

Будзинска-Тополовска и Рutowский [42] разделили пять тритерпеновых спиртов, полученных из неомыляемой фракции рапсового масла, на силикагеле, элюируя пробу смесью циклогексан—этилацетат (4 : 1). Федели др. [43] исследовали тритерпеновые спирты, содержащиеся в 18 видах растительного масла. Вольман и др. [44] анализировали на силикагеле свободные терпеновые спирты *Pelargonium roseum*, элюирующим растворителем служила смесь этилацетат—бензол (5 : 95).

### 3. КАРБОНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Миллер и Кирхнер [1] разделили группу из 8 альдегидов и кетонов на хроматографических полосках с кремневой кислотой, элюируя их 10 различными растворителями (табл. 30.5). Пятна альдегидов обнаруживали, опрыскивая хроматограмму раствором *o*-дианизидина в ледяной уксусной кислоте. При обработке флуоресцеином и параами брома можно обнаружить среди кетонов карвон, метилгептенол и пулегон, однако камфору, реакционная способность которой очень мала, удалось обнаружить только при опрыскивании концентрированной серной кислотой, содержащей в качестве дополнительного окислителя азотную кислоту, с последующим обугливанием пятен этого соединения. Катаяма [45], а также Шанц и др. [46] тоже хроматографировали как некоторые из соединений этой группы, так и другие соединения (см. табл. 30.5). Однако следует заметить, что ряд величин  $R_f$ , полученных Катаямой при разделении хлороформом, завышен. Так,  $R_f$  карвона 0,35, указанное Катаямой, сравнимо с  $R_f$  0,37, полученным Миллером и Кирхнером (при использовании хлороформа, не содержащего спирта), тогда как  $R_f$  цитраля 0,36 значительно больше, чем полученное Миллером и Кирхнером (0,15). По-видимому, при разделении соединений с низкими величинами  $R_f$  сильное влияние оказывают следы спирта, служащего ингибирующей добавкой к хлороформу.

Аттавей [47] хроматографировал карвон и цитронеллаль смесями трифтортрихлорэтана и метиленхлорида, взятых в различных соотношениях.

Хейфиц и др. [48] разделили на слоях нейтрального оксида алюминия 15 алкилциклогексанонов, элюируя их смесью бензол—петролейный эфир (1 : 3). Пятна разделенных соединений обнаруживали, выдерживая хроматограммы в парах йода.

Сундт и Саккарди [49] исследовали возможность разделения методом ТСХ полученных из ванили душистых веществ и других ароматических альдегидов, а также нескольких кумаринов. В качестве адсорбента они выбрали силикагель G, элюирующие системы были самыми различными. Наиболее удачные результаты приведены в табл. 30.6, а в табл. 30.7 указаны различные методы обнаружения, использованные этими авторами. Кроме того, Сундт и Саккарди привели величины  $R_f$  тех же соединений, полученные при разделении методом распределительной хроматографии на бумаге, пропитанной диметилформамидом. Основываясь на данных этих авторов, Кахан и Фительсон [50] разработали официальный метод обнаружения душистых добавок в экстракте ванили. Кратцль и Пушман [51] применили ТСХ на силикагеле для разделения ванилина и родственных соединений,



Величины  $R_f \times 100$  терпенов и других, входящих в эфирные масла карбонильных соединений, полученные на силикагеле с различными растворителями

Соединение	Этилацетат - n-гексан (3 : 17)	Этилацетат - хлороформ <sup>а</sup> (1 : 9)	Этилацетат - бензол (3 : 17)	Этилацетат - хлороформ <sup>а</sup> (5 : 95)	1-Нитропропан - гексан (1 : 1)	Этилацетат - гексан (3 : 7)	Этилацетат - гексан (2 : 3)	Этилацетат - хлороформ <sup>а</sup> (3 : 17)	Изопропиловый эфир - гексан (3 : 7)	Изопропиловый эфир - гексан (1 : 1)	Хлороформ <sup>б</sup>	Бензол	Этилацетат - бензол (5 : 95)
Уксусный альдегид	56	39	27 <sup>в</sup>			59	39 <sup>в</sup>				28 <sup>в</sup>	20 <sup>в</sup>	
Анисовый альдегид			22 <sup>в</sup>				57 <sup>в</sup>				33 <sup>в</sup>	22 <sup>в</sup>	41 <sup>а</sup>
Бензальдегид			46 <sup>в</sup>				70 <sup>в</sup>				50 <sup>в</sup>	38 <sup>в</sup>	
Каффора	56	39	55	43	56	59		78	47	50	28 <sup>а</sup>	18 <sup>г</sup>	31 <sup>а</sup>
Каприловый альдегид												21 <sup>г</sup>	42 <sup>а</sup>
Карвон	45	72	62	70	76	79	74 <sup>в</sup>	75	62	65	37 <sup>а</sup>	28 <sup>в</sup>	
Кориичный альдегид	31	70	68	70	68	70	63 <sup>в</sup>	78	52	45	9 <sup>а</sup>	24 <sup>в</sup>	
Цитраль	45	64	57	47	62	62	46 <sup>в</sup>	69	56	51	15 <sup>а</sup>	19 <sup>в</sup>	
Цитронеллаль	49						81 <sup>в</sup>				33 <sup>в</sup>	46 <sup>в</sup>	
Куминовый альдегид													51 <sup>а</sup>
Фенхон	51 <sup>в</sup>						62 <sup>в</sup>				33 <sup>в</sup>	30 <sup>в</sup>	
Фурфураль	21	44	41	41	44	41	66	38	37	17	6 <sup>а</sup>	14 <sup>в</sup>	
Изованилин	54 <sup>в</sup>						32 <sup>в</sup>					2 <sup>в</sup>	
Лауриновый альдегид	58	72	67	62	91	76		84	75	83	50 <sup>а</sup>		
Метилгептенол	48	74	62	58	69	70		75	57	60	35 <sup>а</sup>		
Перриловый альдегид	41 <sup>в</sup>						66 <sup>в</sup>				38 <sup>в</sup>	26 <sup>в</sup>	
Пиперонал	30 <sup>в</sup>						54 <sup>в</sup>				40 <sup>в</sup>	22 <sup>в</sup>	
Пропионовый альдегид	58 <sup>в</sup>						68 <sup>в</sup>				20 <sup>в</sup>	20 <sup>в</sup>	
Псевдоионон	34 <sup>в</sup>							91	72	79	60 <sup>а</sup>		
Пулегон	58	65	76	71	79	83					9 <sup>в</sup>	7 <sup>в</sup>	
Ванилин	7 <sup>в</sup>						36 <sup>в</sup>						

<sup>а</sup> Хлороформ, не содержащий спирта.

<sup>б</sup> См. замечания в тексте.

<sup>в</sup> По данным Катаямы [45], полученным на силикагеле, закрепленном крахмалом (см. замечания в тексте относительно величин  $R_f$ , полученных при элюировании хлороформом).

<sup>г</sup> По данным Шанца и др. [46], полученным на силикагеле. Остальные величины — данные Миллера и Кирхнера [1], полученные на закрепленной крахмалом кремневой кислоте, при длине пути элюирования 10 см.

Таблица 30.6

Величины  $R_f \times 100$  некоторых ванилиновых и кумариновых соединений, полученные на силикагеле G с четырьмя элюирующими системами [49]<sup>а, б</sup>

Соединение	Растворители <sup>в</sup>			
	А	Б	В	Г
Ванилин (4-окси-3-метоксибензальдегид)	30	27	34	29
<i>n</i> -Оксибензальдегид	32	27	11	20
<i>o</i> -Ванилин (2-окси-3-метоксибензальдегид)	39	27	55	45
Метилванилин (3,4-диметоксибензальдегид)	41	38	62	55
Этилванилин (4-окси-3-этоксibenзальдегид)	46	42	62	55
<i>m</i> -Оксибензальдегид	46	37	15	23
2,4-Диметоксибензальдегид	50	44	56	58
Бензилванилин	61	46	67	64
<i>n</i> -Метоксибензальдегид	64	53	70	59
Пиперонал (гелиотропин)	66	60	72	63
<i>o</i> -Метоксибензальдегид	70	62	77	63
Пропенилгвазтол (ванитроп, 1-этокси-2-окси-4-пропенилбензол)	81	74	78	66
Кумарин	50	38	—	—
6-Метилкумарин	55	43	—	—
Дигидрокумарин	62	50	—	—
3-Метилкумарин	68	58	—	—
3-Этилкумарин	81	75	—	—

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Institute of Food Technologists.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 11,5 см.

<sup>в</sup> А — петролейный эфир (50—70°C) — этилацетат (5:2,5); Б — гексан — этилацетат (5:2), В — хлороформ — этилацетат (98:2); Г — декалин — метилхлорид — метанол (5:4:1).

Таблица 30.7

Цветные реакции некоторых ванилиновых и кумариновых соединений при различных методах обнаружения [49]<sup>а</sup>

Соединение	1%-ный раствор гидразинсульфата в HCl		Метанольный раствор КОН		Метанольный раствор КОН и после него диазотированная сульфаниловая кислота
	При дневном свете	В УФ-свете	При дневном свете	В УФ-свете	
	При дневном свете	В УФ-свете	При дневном свете	В УФ-свете	
Ванилин	Желтая	Оранжевая	Желтая (слабая)	Желтая	Розовая
<i>n</i> -Оксибензальдегид	"	Желтая	"	"	Желто-оранжевая
<i>o</i> -Ванилин	"	Красная	"	"	"
Метилванилин	"	Оранжевая	"	"	"
Этилванилин	"	Желтая	"	"	"
<i>n</i> -Оксибензальдегид	"	Желтая	"	"	"
2,4-Диметоксибензальдегид	"	Ярко-желтая	"	"	Желтая (очень слабая)
Бензилванилин	Желтая (слабая)	Желтая	"	"	"
<i>n</i> -Метоксибензальдегид	Желтая	Желто-зеленая	"	"	"
Пиперонал (гелиотропин)	"	Темное пятно	"	"	"
<i>o</i> -Метоксибензальдегид	"	Желтая	"	"	"
Пропенилгвазтол	"	"	"	"	"
Кумарин	"	"	"	"	Красно-оранжевая
6-Метилкумарин	"	"	"	"	Оранжевая
Дигидрокумарин	"	"	"	"	Фиолетовая
3-Метилкумарин	"	"	"	"	Оранжевая
3-Этилкумарин	"	"	"	"	Оранжево-розовая

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Institute of Food Technologists.

полученных при разложении лигнина; они составили таблицу величин  $R_f$ .

Донт и Дийкмен [52], применив многократное (6×) элюирование бензолом, разделили на слоях силикагеля G в равновесной системе  $\alpha$ - и  $\beta$ -ионон,  $\alpha$ - и  $\beta$ -метилюонон и псевдоионон. При опыскивании 2,4-динитрофенилгидразином или раствором ванилина в серной кислоте можно обнаружить эти соединения в количествах  $\geq 2$ —5 мкг.

Терпеновые карбонильные соединения хроматографируют также в виде 2,4-динитрофенилгидразоновых производных. Еще в 1952 г. Оноэ [53] разделял на хроматографических полосках с силикагелем *n*-алифатические альдегиды вплоть до C<sub>10</sub>, а также акролеин, кротонный альдегид и цитраль. Вашист и Ханда [54] выделили оксотерпен в виде 2,4-динитрофенилгидразонового производного, используя силикагель и смеси хлороформ—тетрахлорид углерода (1:9, 1:19 и 3:17) и петролейный эфир—бензол (3:7). В их работе приведены величины  $R_f$ . Лашарм [55] улучшил методику спектрофотометрического определения камфоросульфоната натрия в виде производного 2,4-динитрофенилгидразона, удаляя избыток реагента путем хроматографирования на слоях силикагеля. Нано и Санцин [56] разделяли на силикагеле производные  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйонов, а также других терпеновых карбонильных соединений, элюируя пробы смесью бензол—циклогексан (1:1). В их работе дана таблица величин  $R_f$ . Количественное определение туйона проводили, экстрагируя его с силикагеля и измеряя поглощение экстракта при 361 нм. Данные по разделению некоторых выделенных из пищевых продуктов карбонильных соединений в виде производных 2,4-динитрофенилгидразона см. в табл. 20.3 (ч. 1, гл. 20).

Донт и Мульдерс-Дийкман [57] хроматографировали 2,4-динитрофенилгидразоны 22 терпенов в трех следующих хроматографических системах: силикагель G и смесь бензол—гексан (1:1); силикагель G, пропитанный парами нитрометана, и гексан; силикагель G, пропитанный парами ацетонитрила, и гексан. Пропитка парами проводилась следующим образом: слой, который нужно было пропитать, клали между двумя слоями, насыщенными пропитывающим растворителем. Авторы работы [57] привели величины  $R_f$  производных 24 карбонильных соединений, не относящихся к терпенам. Весьма эффективным оказалось также двумерное разделение, которое проводили в одном направлении на непропитанном слое, а во втором направлении с помощью одной из пропитанных систем. Мартелли [58] хроматографировал пиперитон, карвон, изоментон, ментон,  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйоны, а также некоторые эфирные масла на пропитанном 2,4-динитрофенилгидразином силикагеле, элюируя пробу бензолом, хлороформом и смесью циклогексан—хлороформ (1:1). Он при-

вел также дополнительные данные о разделении большого числа других карбонильных соединений.

Ротбехер и Сутеу [59] хроматографировали бензолом на силикагеле G ментон, дигидрокарвон, пулегон, карвон, пиперитон, карвенон и пиперитенон.

Белл и др. [60] хроматографировали на полиамиде сесквитерпеновые альдегиды, элюирующими растворителями служили смеси хлороформ—ацетон—муравьиная кислота (95:4:1) и этилацетат—гексан (1:3).

#### 4. ФЕНОЛЫ

Клоувен и Тер-Хейде [61] хроматографировали на высушенных при 105°C слоях силикагеля G большое число фенолов и простых фенольных эфиров. Величины  $R_f$  чистых соединений (табл. 30.8) определяли следующим образом. Исследуемые соединения наносили на пластинки в виде 1%-ного ацетонового раствора таким образом, чтобы на пятно приходилось 10—20 мкг данного соединения. Элюирование вели хлороформом, смесями петролейный эфир (80—100°C)—уксусная кислота (95:5) и петролейный эфир (80—100°C)—пиридин (95:5). Для обнаружения пятен использовали семь различных цветных реакций (результаты применения двух из них даны в табл. 30.8). Обычно по совокупности величин  $R_f$  большой группы соединений, подобной данной группе, можно сделать ряд обобщений в отношении закономерностей влияния разных функциональных групп на величину  $R_f$  (хотя при этом следует помнить, что в некоторых растворителях характер этих закономерностей меняется).

1) Полярность соединения возрастает с увеличением числа OH-групп: фенол < пирокатехин < пирогаллол. 2) Метилирование оксигруппы уменьшает полярность соединения: диметилгидрохинон < *n*-оксианизол < гидрохинон и гваякол < пирокатехин. 3) Увеличение размера алкилирующей группы приводит к уменьшению полярности: пропенилгваэтол < изохаивбетол, бензилэвгенол < метилэвгенол. 4) Увеличение размера алкильного заместителя при кольце приводит к уменьшению полярности: дигидроэвгенол < крезол (заметьте, однако, что гваякол < крезол). 5) Как можно было ожидать, гидрирование боковой цепи очень мало влияет на полярность, это видно из сравнения дигидроэвгенола и эвгенола. 6) Образование связи между двумя соединениями с оксигруппами через метиленовую группу, т. е. образование метилendioксигруппы, уменьшает полярность по сравнению с соответствующим соединением с двумя метокси-группами: сафрол < метилэвгенол и изосафрол < метилизоэвгенол. 7) Сравнивая два *орто*-соединения—гваякол и гваэтол—

Величины  $R_f \times 100$  (относительно тимола) фенолов и простых эфиров фенолов, обнаруженных в эфирных маслах [61] <sup>a</sup>

Соединение	Хороформ	Петролейный эфир (80-100°С) — углеродная кислота (95 : 97)	Петролейный эфир (95 : 97)	Окраска, вызываемая смесью			
				$Sb_2Cl_5 + CCl_4 (1 : 4)$			
				20° С	110° С	20° С	
Эвгенол	124	137	104	Сине-фиолетовая	Серо-коричневая	110° С	Желто-коричневая
	148	128	235	"	Серая	20° С	
метилловый эфир бензилловый эфир	153	237	282	Красно-коричневая	Коричневая		
	154	187	393	Коричневая	"		
Мирястицин	166	500	425	Желтая	Желто-коричневая		
Метилловый эфир хавикола	164	545	573	Серая	Сине-черная		
Сафрол	120	123	97	Сине-фиолетовая	Серо-коричневая	Ярко-желтая	"
Изоэвгенол	118	133	93		Красно-коричневая		Желтая
Изохавибетол	138	146	165	Желто-коричневая	Коричневая		Слабо-розовая
Пропенилгвазтол	152	130	223	Сине-фиолетовая	Серо-фиолетовая	"	Желтая
Метилловый эфир изоэвгенола	165	208	244	Красно-коричневая	Коричневая		Слабо-желтая
Бензилловый эфир изоэвгенола	158	191	339	Фиолетовая	Фиолетовая		Желтая
Изомиристицин							
Анегол	166	493	532	Сине-фиолетовая	"	"	Ярко-желтая
Изоафрол	166	506	550	Серая	Серая	Оранжевая	"
$\alpha$ -Нафтол	67	43	50			Розовая	Оранжево-красная
$\beta$ -Нафтол	52	32	41	Желто-коричневая	Серо-коричневая		Слабо-розовая
	168	341	518	"	Серая		"
метилловый эфир этиловый эфир	164	400	637	Серо-коричневая	"		Розовая
изобутиловый эфир	176	449	800	"	"		Фиолетовая
$n$ -Оксанол	37	14	35				Оранжево-коричневая
3,4-Метилendioксифенол	42	18	39	Зеленая	Серо-зеленая	Оранжевая	невая
Фенол	49	47	60		Серая		Коричневая
Гваякол	113	145	138		"		"
Диметилловый эфир гидрохинона	124	177	177	Серо-синяя	Серо-синяя		"
	156	336	396		Желто-коричневая		"
Крезол	107	102	131	Коричневая	То же	Желто-коричневая	Розовая
Дигидроэвгенол	120	198	138		Желто-коричневая		Слабо-розовая
Карвакрол	94	110	110	"	Коричневая	Розовая	Коричневая
Тимола	100	100	100	Красно-коричневая	Красно-коричневая	"	"
Изогимол	67	63	81				Красно-коричневая
Пирокатехин	10	0	10	Синяя	Серо-синяя		То же
Резорцин	0	0	0	Зеленая	Коричневая	Оранжево-желтая	Оранжевая
Гидрохинон	2	0	0		Желто-коричневая	Желтая	Ярко-синяя (УФ)
Пирогаллол	0	0	0		Коричневая		Желто-коричневая
Флороглюцин	0	0	0		"	Оранжево-желтая	Красно-коричневая
Орсин	3	0	0		"	Оранжевая	Оранжевая

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Dr. Alfred Huetthig Verlag.<sup>б</sup> В большинстве случаев можно усилить окраску, опрыскивая хроматограмму раствором карбоната натрия.

с *n*-оксианизолом, можно наблюдать влияние образования внутримолекулярной водородной связи и сопутствующего ей уменьшения полярности.

Хейфиц и др. [48] хроматографировали 33 фенола на незакрепленных слоях нейтрального оксида алюминия, используя как элюирующий растворитель смесь бензол—метанол (9:1). Пятна разделенных соединений они обнаруживали обработкой пластинки парами йода.

Уанг [62], а также Лин и др. [63] разделили фенолы на слоях полиамида (см. табл. 27.3).

Бакши и Кришнасами [64] анализировали методом ТСХ продукты реакции карданол с формальдегидом, проводившейся в щелочной среде. При этом были обнаружены три метильных производных, а четвертое пятно давал не вступивший в реакцию карданол.

Тиме [65] разделил на неактивированных слоях силикагеля тимол и карвакрол, используя как элюирующий растворитель смесь бензол—тетрахлорид углерода—*o*-нитротолуол (1:1:1): величины  $R_f$  указанных соединений соответственно равны 0,6 и 0,52.

Фрейзер и Свен [66] разделили 12 фенольных тритерпенацетатов на силикагеле или оксиде алюминия G с помощью петролейного эфира, метилхлорида или диэтилового эфира.

##### 5. КИСЛОТЫ И СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ

Некоторые кислоты, входящие в состав эфирных масел, рассматриваются в гл. XIII (т. 1), а влияние различных комплексообразующих агентов на разделение фенолокарбоновых кислот обсуждается в гл. III, разд. 4.

Чеше и др. [67] хроматографировали ряд тритерпеновых кислот, содержащихся в *Bredemeyera floribunda*, *Alphitonia excelsa* и *Crataegus oxyacantha*. Они проводили разделение на слоях силикагеля G; большинство разделяемых веществ элюировалось смесью диизопропиловый эфир—ацетон (5:2) (табл. 30.9). Поскольку кохалева, бредемолева и махеринова кислоты образуют прожилки при элюировании указанной смесью, их хроматографируют смесью, к которой предварительно добавляют 5% пиридина. В результате Чеше и соавторы получили следующие величины  $R_f$ : 0,15, 0,62 и 0,27. Положение пятен обнаруживали, опрыскивая хроматограммы хлорсульфоновой кислотой. Этот метод обнаружения отличается высокой чувствительностью (0,02 мкг олеанолевой кислоты). Однако описанным способом нельзя разделить олеанолеву, урзолову и бетулинову кислоты, поэтому авторы использовали хроматографию на анионообменной бумаге и элюировали пробу насыщенными муравьиной кислотой смесями циклогексан—толуол (4:1) или метилцикло-

Таблица 30.9

Величины  $R_f$  тритерпеновых кислот, полученные на слоях силикагеля G со смесью диизопропиловый эфир—ацетон (5:2) [67]<sup>a</sup>

Кислота	$R_f$
Олеановая	0,68
Урзоловая	0,68
Бетулиновая	0,68
Моролева	0,59
Олеанолевая	0,68
Мастикадиеновая	0,47
Изомастикадиеновая	0,47
Кохалева	0,18 <sup>b</sup>
Бредемолева	0,59 <sup>b</sup>
Сиарезинолева	0,66
Махериновая	0,23 <sup>b</sup>
Гвияволевая	0,35
Акантолевая	0,29
Хиновая	0,55
Медикагеновая	0,29 <sup>b</sup>
Эммолевая	0,59

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co  
<sup>b</sup> Образование «хвостов»

гексан—хлороформ (4:1). На слоях силикагеля с применением различных элюирующих систем разделяют также метиловые эфиры этих кислот. Хунек [68] исследовал тритерпеновые кислоты *Liquidambar orientalis*. Брискорн др. [69] выделили урзоловую кислоту из листьев *Pirus malus*. Авторы работы [70] исследовали тритерпеновые кислоты, содержащиеся в оливковом масле. Томас и Мюллер [71] хроматографировали метиловые эфиры тритерпеновых кислот *Commiphora glandulosa*. Эти эфиры разделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле, а чистоту фракций проверяли с помощью ТСХ, элюируя пробу смесью хлороформ—этилацетат (4:1). Бонати [72] разделял 18 $\alpha$ - и 18 $\beta$ -глицерретовые кислоты смесью этилацетат—метанол—диэтиламин (14:4:3).

Величины  $R_f \times 100$  некоторых терпеновых сложных эфиров, полученные на хроматографических полосках с кремневой кислотой, закрепленной крахмалом [1] а, б

Сложный эфир	Этилацетат—гексан (15 : 85)	Этилацетат—хлороформ (без лобавки спирта) (6 : 1) (1 : 1) (1 : 1)	Этилацетат—бензол (15 : 85)	Этилацетат—хлороформ (без лобавки спирта) (3 : 95)	1-Нитропропан—гексан (1 : 1)	Этилацетат—гексан (3 : 7)	Этилацетат—хлороформ (без лобавки спирта) (15 : 95)	Изопропилацетат—гексан (3 : 7)	Диэтилопропилацетат—гексан (1 : 1)	Хлороформ (без лобавки спирта)
Геранилацетат	51	69	66	52	81	72	90	71	73	27
Нерилацетат	55	69	55	50	86	69	86	69	73	39
Цитронеллилацетат	58	68	66	57	91	81	89	75	84	35
Октилацетат	72	98	98	82	90	85	92	92	87	50
Терпинилацетат	58	66	61	55	90	75	86	73	85	42
Метилантранилацетат	42	52	65	53	62	65	72	49	46	26
Этилантранилацетат	41	58	70	46	79	67	84	58	53	25
N-Метилметилантранилацетат	58	75	74	71	91	78	90	69	79	56
Карвилацетат	66	69	79	67	96	84	91	77	84	64

<sup>а</sup> С разрешения American Chemical Society.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

Бероза и Джонс [73] хроматографировали пиперониловую, 5-, 2- и 6-метоксипиперониловые кислоты на слоях силикагеля в камере с насыщенной атмосферой, используя как элюирующий растворитель смесь этилацетат—гексан—уксусная кислота (50:50:0,5). Полученные ими величины  $R_f$  равны соответственно 0,64, 0,54, 0,47 и 0,37. Разделенные соединения обнаруживали, опрыскивая пластинки реактивом на основе хромотропной и серной кислот.

Норин и Вестфельт [74] разделили метиловые эфиры смоляных кислот, выделенных из *Pinus silvestris*, на силикагеле, пропианном нитратом серебра, элюируя пробу бензолом, и получили следующие величины  $R_f$ : пимаровая 0,40, сандаракопимаровая 0,27, изоимаровая 0,32, левоимаровая 0,50, палюстровая 0,60, дигидрабиетовая 0,83, биетовая 0,75 и необиетовая 0,73.

Миллер и Кирхнер [1] хроматографировали несколько терпеновых сложных эфиров с 10 различными элюирующими системами (табл. 30.10). Для обнаружения этих соединений они пользовались флуоресцеино-бромным реактивом; антранилаты обрабатывать этим реактивом не нужно, их легко обнаружить по флуоресценции при облучении УФ-светом.

Аттавей [47] предпочел заменить бензол в экстракционной хроматографии подобных соединений на смесь трифтортрихлорэтан—метилхлорид (3 : 2), поскольку у нее более низкая температура кипения (36°C по сравнению с 80°C для бензола), и поэтому при удалении растворителя потери исследуемых соединений меньше. Этот автор приводит величины  $R_f$  ряда эфиров, а также карвона и цитронеллала, полученные при элюировании указанными растворителями на слоях силикагеля.

## 6. ОКСИДЫ И ПЕРОКСИДЫ

Миллер и Кирхнер [1] разделяли 1,8-цинеол и монооксид линалоола с 10 элюирующими растворителями, приведенными в табл. 30.10; эти два соединения легко разделяются с помощью любого из растворителей указанной группы. Например, при элюировании смесью нитропропан—гексан (1 : 1) эти авторы получили  $R_f$  соответственно 0,73 и 0,08, а при элюировании смесью этилацетат—гексан (15 : 85) — соответственно 0,48 и 0,21. Катаяма [45] хроматографировал 1,8-цинеол и аскариндол с 6 различными растворителями и получил со смесью этилацетат—*n*-гексан (15 : 85)  $R_f$  соответственно 0,49 и 0,45, а в хлороформе — соответственно 0,27 и 0,21. Ясперсен-Шиб [17] получил на силикагеле  $R_f$ , равное 0,82, для ментофурана, используя как элюирующий растворитель 5 %-ный раствор этилацетата в бензоле. В качестве обнаруживающего реагента он пользовался смесью концентрированной азотной и уксусной кислот (1 : 300). После

обработки пластинки этим реагентом и последующей 5—10-минутной сушки при 100 °С ментофуран дает красное пятно (в УФ-свете пятно оранжево-красное). Феликс и др. [75] проверяли чистоту оксида линалоола по хроматографии на слоях оксида алюминия G.

Нигам и др. [76] использовали газо-жидкостную и тонкослойную хроматографию для выделения и количественного определения в эфирных маслах оксида пиперитона, а также пиперитона. Соответствующий эпоксид был сначала обнаружен в *Mentha avensis*, *M. piperita*, *Eucalyptus dives* и *E. numerosa*.

Маль и др. [77] исследовали методом ТСХ эпоксидирование терпеноидов. Адсорбентом при этом служил силикагель, а растворителем — смесь петролейного и диэтилового эфиров (5:1). Дарсель [78] разделял с помощью ТСХ пероксиды, входящие в состав скипидара.

## 7. ЭФИРНЫЕ МАСЛА

### Масла мяты

В 1953 г. Ито и др. [21, 79] первыми воспользовались методом ТСХ при исследовании мятных масел; в настоящее время этим маслам посвящено большое число работ. Мятные масла разделяли на хроматографических полосках с закрепленной крахмалом кремневой кислотой. Положения пятен определяли, опрыскивая хроматограммы сначала насыщенным водным раствором ванилина, а затем концентрированной серной кислотой. Рейтсема и др. [80—83] сравнили хроматограммы образцов мяты разных сортов. Исследование листьев показало, что количественный состав масла меняется в зависимости от возраста листа. В более старых листьях обнаружены большие количества сильнее восстановленных форм соединений. Авторы [80—83] анализировали также пробы масла перечной мяты, выращенной в атмосфере, содержащей радиоактивный диоксид углерода. Баттайл и др. [84, 85] изучали с помощью метода ТСХ биосинтез терпенов в перечной мяте и родственных ей других сортах мяты. Анализ проб растений, выращенных в атмосфере, содержащей радиоактивный диоксид углерода, показал, что терпены синтезируются в молодых листьях. Хотя эти авторы применяли несколько обнаруживающих реактивов, но в тех случаях, когда после разделения пятна пластинки опрыскивали только 0,05 %-ным раствором родамина В, следовые количества родамина В, обнаруженные в элюате, можно удалить повторным хроматографированием.

Ясперсен-Шиб [17] исследовал различные товарные образцы ментоловых масел и нашел, что подделки из других видов

*Mentha* можно легко обнаружить в маслах *Mentha piperita*. Перцев и Пивненко [86], а также Каравия и Вахба [87] анализировали методом ТСХ масла перечной мяты. Ротбехер и др. [88] изучали компонентный состав масла румынской перечной мяты. Гурвич [89] использовал полуколичественный метод определения ментола в маслах перечной мяты, применив для этого радиальную хроматографию на покрытых алюмосиликатом пластинках, где пробы масла перечной мяты сравнивались со стандартными пятнами ментола. Нигам и Леви [90] определяли содержание ментофурана в *Mentha arvensis* и других видах мяты (см. разд. 6 о содержании оксида пиперитона в мятных маслах), сочетая газовую и тонкослойную хроматографию. Хефендель [91] исследовал состав *Mentha aquatica*, а Влахов и Огнянов [92] выделили 23 соединения из сесквитерпеновой фракции масла болгарской перечной мяты. Деринг и др. [93] идентифицировали в масле перечной мяты ментол, ментон, ментофуран и цинеол, элюируя пробу на силикагеле G смесью бензол—этилацетат (5:1) или хлороформом.

### Масла хмеля

Ригби и Бетьюн [94] в 1955 г. использовали ТСХ для изучения душистых веществ, содержащихся в хмеле, поскольку эти соединения определяют аромат и вкус пива. Комбинируя тонкослойную хроматографию с противоточным распределением, они обнаружили 26 компонентов и некоторые из них идентифицировали. Куроива и Хашимото [95—103] исследовали лупулоны и гумулоны — горькие вещества, входящие в состав хмеля и пива. Они применяли хроматографические полоски с силикагелем, закрепленным крахмалом, и частично цеолит (Dow). Поскольку для регулирования горького вкуса пива важно знать состав содержащихся в хмеле горьких веществ, эти авторы разработали хроматографический метод количественного их определения: пятна элюируют с хроматограммы и измеряют оптическую плотность элюатов гумулонов при 325 нм и элюатов лупулонов при 355 нм. Эти же авторы [104, 105] выясняли причины появления специфического привкуса у пива, находившегося на солнце, и установили, что этот привкус обусловлен появлением 3-метилбутен-2-тиола-1, образующегося, по-видимому, в результате реакции какого-либо сульфгидрильного соединения с продуктами разложения изогумулонов. Айткен и др. [106, 107] определяли содержание веществ, придающих пиву горечь, хроматографируя его экстракты на силикагеле смесью бензол—диэтиловый эфир (16:1). После разделения пробы они элюировали пятна соединений с пластинки и измеряли при 275 нм поглощение подкисленного элюата.

### Масла цитрусовых

Характерный вкус и аромат придают соку цитрусовых эфирные масла, содержащиеся в этих фруктах. Некоторые из этих масел содержатся в чрезвычайно малых количествах, хотя присутствие их определяет вкус сока. Чтобы выделить такие масла, Кирхнер и др. [108—110] переработали большие количества апельсинового и грейпфрутового сока. Из-за малости получаемых количеств масел (35 г окисленных соединений из  $12 \cdot 10^3$  л сока) для разделения многочисленных соединений, входящих в состав этих масел, необходим микрометод. Именно такая задача стояла перед автором книги и его коллегами, когда они отработывали и совершенствовали методику современной ТСХ [1, 2]. С помощью разработанных ими методов удалось разделить и идентифицировать компоненты соков цитрусовых. Аттавей и др. [19, 111] применяли ТСХ, газовую хроматографию и хроматографию на бумаге для идентификации летучих душистых веществ, содержащихся в апельсиновой эссенции, которую в свою очередь получают из апельсинового концентрата. Пейрон [112] с помощью ТСХ разделил и идентифицировал флуоресцирующие вещества, извлеченные из цитрусовых. Милле и др. [113] использовали газовую и тонкослойную хроматографию для сравнения проб масла, полученных путем непосредственного прокалывания секретирующих клеток апельсинов, с пробами, полученными классическими методами. Ландграф [114] исследовал эфирные масла, извлеченные из лимонов, грейпфрутов и апельсинов, а Рисполи и др. [115] исследовали масло сицилийских грейпфрутов. Стэнли и др. [116—122] широко применили этот метод для анализа компонентов лимонного масла, в том числе ряда кумариновых соединений.

Д'Амор и Калапай [123] выделили на силикагеле флуоресцирующие вещества из лимонного, бергамотового, мандаринового, горького апельсинового и сладкого апельсинового масел, элюируя пробу смесью гексан—этилацетат (3:7). Циери [124] выделил кумарины и фурукумарины из бергамотового и лимонного масел, а также масел семян и корней дудника и идентифицировал эти соединения по их величинам  $R_f$  и по характеристической флуоресценции. После этого он элюировал пятна этих соединений с хроматограмм и определял их содержание спектрофотометрически. Мак-Леод и Бьюгес [125] анализировали методом ТСХ лимонное масло. Чтобы различить отжатые на холоду образцы масла из различных разновидностей лимона, они применяли двумерную хроматографию на слоях силикагеля, проводя элюирование в одном направлении смесью хлороформ—уксусная кислота—тетрахлорид углерода (30:1:69), а в другом—смесью этилацетат—уксусная кислота—циклогексан (20:1:79). Дистил-

лированные лимонные масла обнаруживали очень слабую флуоресценцию. Мадсен и Лац [126] анализировали разные сорта лимонных масел методом флуориметрии *in situ*. Икеда и др. [127] сочетали ТСХ на полосках с газовой хроматографией при определении состава смеси монотерпенов, входящих в различные цитрусовые масла.

Бернгард [128] применил метод хроматографических полосок для разделения и идентификации пяти кумариновых соединений, содержащихся в лимонном соке. Мартинец Надаль [129] опубликовал обзор по применению ТСХ для определения цитраля в цитрусовых и других эфирных маслах. Вердерис и Вентурини [130] исследовали масло, полученное из мандариновой эссенции. Поззо-Бальби и Нобиле [131] проводили хроматографирование на тонких слоях перед газохроматографическим анализом, чтобы классифицировать масла, содержащиеся в кожце плодов *Citrus trifoliata*, по числу функциональных групп. Каравия и др. [132] сравнивали состав масел *Citrus sinensis* и *C. aurantium*, полученных при перегонке с водяным паром или отжатых на холоду, проводя хроматографирование их на силикагеле смесью гексан—этилацетат (17:3). Аттавей и др. [133] использовали тонкослойную и газовую хроматографию, а также масс-спектрометрию для анализа масел, полученных из листьев 11 разновидностей цитрусовых. Майер и Грант [134] выделили из экстракта цитрусовых горькую основу, лимонин, элюируя пробу на силикагеле верхней фазой смеси уксусная кислота—вода—этанол—бензол (1:15:47:200). Количественное определение они проводили денситометрически или сравнивали визуально пятна анализируемых и стандартных соединений. Чувствительность этого метода составляет  $\geq 0,5 \cdot 10^{-4}$  %.

### Летучие вещества, содержащиеся в морских водорослях

Катаяма [135—142] провел обширное исследование летучих веществ, содержащихся в различных видах морских водорослей, сочетая разделение на хроматографических полосках с методами перегонки. Эти вещества относятся главным образом к группе терпенов, хотя среди них обнаружено и несколько низкомолекулярных алифатических кислот.

### Прочие работы по анализу эфирных масел методом ТСХ

Вагуйфальви и Тиihak [143] изучили 60 реагентов, предназначенных для обнаружения различных веществ, выделенных из эфирных масел методами ТСХ. В этих опытах использовались 10 различных эфирных масел. Как обнаруживающие реактивы при исследовании эфирных масел рекомендованы 29 реагентов,



Таблица 30.11

## Дополнительные работы по тонкослойной хроматографии эфирных масел и терпенов

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1952	Монтес	Общее исследование эфирных масел	150
1953	Генсхирт	Масла <i>Aristolochia clematitus</i>	151
1954	Грюнер и Шпайх	Настойки <i>Arnica montana</i>	152
1955	Ковени и др.	Масло <i>Strobilanthisopsis linifolia</i>	153
1955	Кайзер	Масло и смолы видов <i>Grindelia</i>	154
1955	Гарсия де Надаль	Обзор	155
1955	Уозерспун и Бедукиян	Окисленные соединения, содержащиеся в эфирных маслах	156
1956	Демоль	Изофитол в жасмине	157
1956	Ониши и др.	Масло табачных листьев	158
1956	Шталь и др.	Хамазулен и его производные	159
1957	Аллентофф и Райт	Продукты реакций реактивов Гриньяра с терпенами	160
1957	Фридман и др.	Терпены	161
1957	Фридман и др.	Различные эфирные масла	162
1957	Фридман и др.	Различные эфирные масла	163
1957	Гарсия де Мартинаец	Очистка лаврового масла от терпенов	164
1957	Надаль	Эфирное масло пачулей	165
1957	Гореф	Масло табачных листьев	166
1957	Ониши и др.	Масло табачных листьев	167
1957	Ямамото и Фурукава	Терпены	168
1957	Ямамото и др.	Терпены	168
1958	Демоль и Ледерер	Масло жасмина	169
1958	Клор-Мейнхардт	Действие света на образование масла в <i>Pedtoselinum</i> s. и <i>Levisticum</i> o.	170
1958	Клор-Мейнхардт	Влияние прививки на образование масел	171
1958	Ледерер	Обзор по терпенам	172
1958	Ониши	Масло табачных листьев	173
1958	Прайор и Брайант	Эвкалиптовое масло	174
1958	Шталь	Ромашковое масло, искусственное масло мускатного ореха	175
1958	Шталь	Разные масла, смолы и балзамы	176
1958	Суга	Продукты окисления терпенов	177
1959	Катаяма и Нагаи	Масло семян кориандра	178
1959	Катаяма и Нагаи	Масло мускатного ореха	179
1959	Винклер и Лунау	Масло <i>Curcuma xanthorrhiza</i> и <i>C. longa</i>	180
1960	Аказав	Ипомеаморон	181
1960	Аказав и Уритани	Ипомеаморон и кумарины в пораженном грибом сладком картофеле	182

Продолжение табл. 30.11

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1960	Брискорн и Венгер	Масло аптечного шалфея	183
1960	Галлардо и Монтес	Терпеновые углеводороды	184
1960	Фуджита	Окисление лимонена	185
1960	Ледерер	Дитерпены	186
1960	Марбет и Соси	Псевдионон и аналогичные соединения	187
1960	Тетении	Содержание азулена в римской ромашке	188
1960	Вульф и Шталь	Масло <i>Acorus calamus</i>	189
1961	Аказав и Вада	Ипомеаморон, количественный анализ	190
1961	Херхаммер и др.	Олеиновые кислоты в <i>Radix Panax Ginseng</i>	191
1961	Картцль	Биогенез лигнинов	192
1961	Нейберн де Толедо и Васицкий	Масла сассафраса, цитронеллы и перечной мяты	193
1961	Париз и Годон	Различные эфирные масла	194
1961	Занини и др.	Масло <i>Pinus pumilio</i>	195
1962	Аказав и др.	Биосинтез ипомеаморона	196
1962	Брискорн и Полониус	Германикол в <i>Salvia officinalis</i>	197
1962	Дезюсс и Габбаи	Содержание метилантранилата в меде из цветков апельсина	198
1962	Эль-Дееб и др.	Тминное и лимонное масла	199
1962	Габель и др.	Тимол и карвакрол в масле чебреца	200
1962	Херхаммер и Вагнер	Вещества, входящие в состав <i>Ammi visnaga</i> и <i>Ammi majus</i>	201
1962	Хунек	Тритерпены	202
1962	Хунек и Лен	Тритерпены	203
1962	Хунек и Лен	Тритерпены	204
1962	Ясперсен-Шиб и Флюк	Разные терпены	205
1962	Йорк	Смолы и балзамы	206
1962	Лави и др.	Тритерпены	207
1962	Морган и Перейра	Продукты перегонки с водяным паром травяного и кукурузного сырья	208
1962	Нигам и Кумари	Различные эфирные масла	209
1962	Перцев и Пивненко	Масла кориандра, лаванды и мускатного ореха	210
1962	Шейдеггер и др.	Дитерпены	211
1962	Шрейбер и Осске	Тритерпены в листьях картофеля	212
1962	Шульте	Полиины и терпены в корнях <i>Arnica montana</i> и <i>A. foliosa</i>	213
1962	Тнихак и Вагуйфальви	Масла <i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Achillea millefolium</i> и <i>Artemisia absinthium</i>	214
1963	Бхрамарамба и Сидху	Масло листьев индийской корицы	215
1963	Борковский и Пазих	Обзор по тритерпеноидам	216
1963	Бруд и Даневский	Количественное определение линалоола в линалилацетате	217

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1963	Капелла и др.	Тритерпеновые спирты	218
1963	Джерасси и др.	Изомерные циангидрокарвоны	219
1963	Фу и др.	Тритерпеноиды в <i>Oldenlandia pinifolia</i>	220
1963	Граб	Количественное изучение составов из римской ромашки	221
1963	Грэм и Маквиллин	Синтез терпенов	222
1963	Херхаммер и др.	Вещества, выделенные из плодов <i>Angelica silvestris</i>	223
1963	Херхаммер и др.	Сесквитерпены <i>Folia farfarae</i> и <i>F. petasites</i>	224
1963	Херхаммер и др.	Тритерпены <i>Crataegus oxyacantha</i>	225
1963	Икан и Кешмен	Тритерпеноиды в торфе Хула	226
1963	Икан и др.	Тритерпены	227
1963	Кауфман и Сен Гупта	Терпены в масле кофейных бобов	228
1963	Мангони и Белардини	Тритерпены в дубовых чернильных орешках	229
1963	Париз и Годон	Различные масла	230
1963	Пазих	Тритерпеновые масла (сапонины <i>Primula officinalis</i> и <i>P. elatioris</i> )	231
1963	Пейрон	Обзор работ по круговой хроматографии (на бумаге и тонкослойной)	232
1963	Рамо	$\beta$ -Орсиновые депсидоны	233
1963	Рамо	Депсиды и депсидоны	234
1963	Шанц	Обсуждение методов	235
1963	Шульце и др.	Полиацетилены	236
1963	Смит и др.	Циклизация изопреноидных соединений	237
1963	Чеше и др.	Тритерпены, состав эсцина	238
1963	Чеше и др.	Тритерпены, структура бредомолевой кислоты	239
1963	Тийхак и др.	Состав масел дикой и садовой ромашки	240
1963	Форбрюгген и др.	Терпеноиды в индийских лекарственных растениях	241
1963	Веллендорф	Масло датской фармакопей	242
1964	Бергстрем и Лагеркранц	Дифенилпикрилгидразил как реактив на терпены	243
1964	Демоль	Общее обсуждение	244
1964	Демоль	Терпеновые фенолы	245
1964	Херхаммер и др.	Эфирные масла египетского базилика	246
1964	Херхаммер и др.	Умбеллифероновые масла, применяемые при изготовлении лекарств	247
1964	Икан и др.	Тетра- и пентациклические тритерпены	248
1964	Кауфман и Сен Гупта	Тритерпены кофейных бобов	249

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1964	Коеи и др.	Хроматография $\alpha$ - и $\beta$ -амирина на слоях $Al_2O_3$ , пропианного $AgNO_3$	250
1964	Куновиц	Идентификация скипидаров	251
1964	Пасс и Париз	Исследование лекарств, содержащих эфирные масла и смолы	252
1964	Морейра и Сеси	Бензойный бальзам	253
1964	Нано и Мартелли	Разделение туйиловых спиртов	254
1964	Шильхер	Количественное определение соединений, содержащихся в римской ромашке	255
1964	Шелаби и Рихтер	Масло <i>Achillea fragrantissima</i>	256
1964	Шталь	Масло <i>Daucus carota</i>	257
1964	Такеда и др.	Линдералактон и изолиндера-лактон	258
1964	Такеда и др.	Линдестрен и линдеренацетат	259
1964	Чеше и др.	Вещества, выделенные из <i>Gra-tiola officinalis</i>	260
1964	Вернин	Обзор	261
1964	Васицкий	Масло <i>Peumus boldus</i>	262
1964	Волраб	Парафиновые соединения в розовом и лавандовом маслах	263
1964	Цинкель и Рове	Метилловые сложные эфиры смол	264
1965	Бетс	Корица	265
1965	Бхатнагар	Твердые эфирные масла и их клатраты	266
1965	Бланк и др.	Ванилин и этилванилин	267
1965	Элгамал и Файез	Тритерпеноидные кислоты	268
1965	Икан и Меир	Окисленные терпены на силикагеле с $AgNO_3$	269
1965	Краус и Перенин	Азулен в масле <i>Achillea mille-folium</i>	270
1965	Мартин и др.	Вещества, входящие в состав виски «Бурбон»	271
1965	Мосле и др.	Анализ масел холодильных машин на содержание экстракционного эфирного масла	272
1965	Мураками и др.	Тетра- и пентациклические тритерпены	273
1965	Нано и др.	Эфирное масло <i>Absinthium gentile</i>	274
1965	Нигам и др.	Таксономические приложения	275
1965	Пазешниченко и Гусева	Применение $\pi$ -комплексов при разделении и количественном определении эфирных масел	276
1965	Шульц и Морман	Вещества, входящие в состав <i>Allium sativum</i>	277
1965	Вердеро и Вентурини	Мандариновое масло	278
1965	Вролстад и Дженнингс	Изомеризация терпенов	279
1965	Зачко-Шаш и Шаш	Анисовое масло	280

## Продолжение табл. 30.11

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1966	Эль-Хамиди и Ахмед	Состав масел зонтичных	281
1966	Гогия	Терпены и ароматические спирты в эфирном масле чая	282
1966	Муноз Теран	Эфирные масла в помадах, притираниях и лосьонах	283
1966	Невес и др.	Эфирное масло <i>Eucalyptus saligna</i>	284
1966	Проэнса Да Кунья	Эфирное масло <i>Eucalyptus punctata</i>	285
1966	Зачко-Шаш и Шаш	Анисовое масло	286
1967	Баруа и др.	Пентациклические тритерпены на силикагеле с AgNO <sub>3</sub>	287
1967	Деринг и др.	Летучее масло <i>Oleum foeniculi</i> и <i>O. anisi</i>	288
1967	Домагалина и Зареба	Тритерпеновая фракция корней <i>Sambucus ebulus</i>	289
1967	Фокс	Вещества, входящие в состав канифоли	290
1967	Мартелли и др.	Эфирное масло сардинского <i>Eucalyptus rostrata</i>	291
1967	Пакраши и Маджумдар	Арборинон <i>Glycosmis arborea</i>	292
1967	Тот	Эфирное масло <i>Foeniculum vulgare</i>	293
1968	Адкок и Бетс	Триметилсилиловые эфиры монотерпеновых спиртов	294
1968	Чаллен и Кучера	Канадский бальзам и смоляные кислоты	295
1968	Лебез	Археологическая амбра и амбра из Балтийского моря	296
1968	Штихер и Флюк	Состав дистиллированных и экстрагированных масел разных видов <i>Mentha</i>	297
1968	Тийхак и др.	Состав эфирного масла римской ромашки	298
1968	Вайссер и др.	Стереохимия 1-окситритерпенов	299
1969	Бауэр и Бразиль э Сильва	Эфирное масло <i>Lippia lycioides</i>	300
1969	Джейн	Эфирное масло <i>Heracleum mantegozianum</i>	301
1969	Ками и др.	Эфирное масло видов <i>Geranium</i>	302
1969	Пенсар	Жирные и смоляные кислоты древесных смол	303
1969	Шталь и др.	Различия в географическом происхождении орегано	304
1970	Бабкин и др.	Сесквитерпены экстракционного эфирного масла <i>Picea ajanensis</i>	305
1970	Эль-Хамиди и Сидрак	Эфирное масло <i>Acacia farnesiana</i>	306
1970	Халим и Коллинз	Масло <i>Comptonia peregrina</i>	307
1970	Йончик	Эфирное масло веток <i>Abies alba</i>	308

## Продолжение табл. 30.11

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1970	Каравия и др.	Эфирное масло египетских разновидностей <i>Labiata</i>	309
1970	Рао и Нигам	Эфирное масло <i>Eugenia bracteata</i>	310
1970	Синсгеймер	Гимнемовые кислоты в листьях <i>Gymnema sylvestre</i>	311
1970	Вандебург и Уайлдер	Состав карнаубского воска	312
1971	Коллинз и Халим	Эфирное масло <i>Calycanthus floridus</i>	313
1971	Гриффин и Паркин	Вещества, входящие в состав <i>Parsonia straminea</i>	314
1971	Джиннес и Тетау	Количественное определение глицирретовой кислоты	315
1971	Мейзингер	Обнаружение в лекарственных препаратах масла <i>Flores chamomillae</i>	316
1971	Поплавский и др.	Сесквитерпеновые лактоны в листьях <i>Arnica montana</i>	317
1971	Шах и др.	Состав <i>Variyali sowa</i> и <i>Ghoda sowa</i> (укропа)	318
1971	Тхапа и др.	Эфирное масло <i>Pogostemon plectranthoides</i>	319
1972	Коннел и Маклечлан	Экстракционные эфирные масла имбиря и зерен парадизки	320
1972	Дроздз и др.	Сесквитерпеновые лактоны <i>Eupatorium cannabinum</i>	321
1972	Эриссе и др.	Масла <i>Illicium verum</i> , <i>Pimpinella anisum</i> , <i>Foeniculum dulce</i>	322
1972	Тер-Хейде	Эфирное масло <i>Cinnamomum cassia</i>	323
1972	Манцини и др.	Эфирное масло листьев <i>Coleus barbatus</i>	324
1972	Попеску и Циупе	Эфирное масло листьев грецкого ореха ( <i>Juglans regia</i> )	325
1972	Кведан	Эфирное масло <i>Catha edulis</i>	326
1972	Рюккер	Моноциклические дитерпены <i>Commiphora mukul</i>	327
1972	Рюэди и Энгстер	Новый дитерпеноид <i>Coleus barbatus</i>	328
1972	Шильхер	Масло <i>Flores chamomillae</i>	329
1972	Виллун	Вещества, входящие в состав видов <i>Arnica</i>	330
1973	Ардон и Накано	Тритерпены коры <i>Ponteria caimito</i>	331
1973	Бальбаа и др.	Масло плодов и ростков <i>Carum copticum</i>	332
1973	Чоген и др.	Продукты щелочного гидролиза шеллака	333
1973	Хабиб и Метвалли	Сесквитерпеновый кетолактон <i>Senecio</i>	334
1973	Хельцль и Демут	Хроматографическое исследование масла римской ромашки	335

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1973	Голуб и Шамак	Сесквитерпеновый лактон <i>Laserpitium archangelica</i>	336
1973	Моралес и Торрес	Содержание смол в воске канделилла	337
1973	Салехиан и Нетъен	Эфирное масло майорана	338
1973	Сенгупта и др.	Выявление различий между <i>Apium graveolens</i> и <i>Carum copticum</i>	339
1973	Тириманна	Эфирное масло черного чая	340
1974	Блехингер	Канифоль и модифицированные смоляные кислоты	341
1974	Бунгерг-Хансинг и Йорк	Микродегидрогенизация сесквитерпеновых спиртов	342
1974	Дро и Хефендель	Анализ масла <i>Ocimum gratissimum</i>	343
1974	Кемпф и Штейнеггер	Масло <i>Oleum anisi</i> и <i>Oleum anisi stellati</i>	344
1974	Каравия и Хифнави	Анализ масла <i>Thymus vulgaris</i>	345
1974	Лихтенштейн и др.	Инсектицидные и синергические соединения, содержащиеся в укропе	346
1974	Мезонеро и др.	Различные эссенции из испанской лаванды	347
1974	Сен и др.	Различия между продуктами из кориандра и разных сортов тмина	348
1974	Тиме и Гартман	Определение глицирризовой кислоты в <i>Radix liquiritiae</i>	349
1975	Банерджи и Митра	Новый тетраортритерпеноид, полученный из ядровой древесины <i>Cedrela toona</i>	350
1975	Бригс и Уайт	Состав эфирного масла <i>Araucaria araucana</i>	351
1975	Будзикович и Ремер	Сесквитерпеновые сложные эфиры в <i>Euonymus europaeus</i>	352
1975	Эльгамал и Эль-Тавил	Новый тритерпеноид из корней <i>Glycyrrhiza glabra</i>	353
1975	Хаггаг и др.	Эфирное масло <i>Achillea millefolium</i>	354
1975	Хельцль и Демут	Влияние экологических факторов на состав масла <i>Matricaria chamomilla</i>	355
1975	Хельцль и др.	Биозинтез масла <i>Matricaria chamomilla</i>	356
1975	Айви и др.	Сесквитерпеновые лактоны в <i>Helenium amarum</i>	357
1975	Намбудури и др.	Тонкослойная хроматография экстракта имбиря	358
1975	Рустембекова и др.	Кислородсодержащие соединения в масле <i>Chenopodium botrys</i>	359

Год	Авторы	Предмет исследования	Литература
1975	Стипанович и др.	Тонкослойная хроматография дезокситерпеноидов	360
1975	Стипанович и др.	Бактерицидные терпеноиды <i>Gossypium</i>	361
1976	Биринг и др.	Тонкослойная хроматография масла <i>Asarum europaeum</i>	362
1976	Верзар-Петри и др.	Состав масла римской ромашки	363

в том числе предложенные Кирхнером и др. [2] концентрированная серная кислота и флуоресцеин в сочетании с парами брома, а также реактивы на основе 70 %-ной хлорной кислоты, концентрированной фосфорной кислоты и растворов различных солей в концентрированной серной кислоте.

Среди обзоров по применению ТСХ для анализа эфирных масел следует упомянуть обзоры Лоуренса [144], Петровича [145] и Кальварано [146].

Исследованию различных эфирных масел посвящено много статей, авторы которых проводили разделение и идентификацию компонентов этих масел методом ТСХ. Обсудить все эти работы практически невозможно, однако в табл. 30.11 мы привели перечень многих таких работ, кратко пояснив способ хроматографирования. Дополнительные ссылки можно найти в библиографиях, указанных во введении к этой книге. Вагуйфальви и др. [147—149] составили основанный на таксономической классификации растений перечень публикаций, в которых ТСХ использовалась для анализа соединений, содержащихся в растениях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Miller J. M., Kirchner J. G. Anal. Chem., 25, 1107 (1953).
2. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
3. Davies B. H., Goodwin T. W., Mercer E. L., Biochem. J., 81, 40P (1961).
4. Grob E. C., Boschetti A., Chimia (Aarau), 16, 15 (1962).
5. Vázquez A., Janer L., Grasas Aceites (Seville, Spain), 13, 242 (1962).
6. Fukushi S., Obata Y., J. Agric. Chem. Soc. Japan, 27, 353 (1953); Chem. Abstr., 50, 15027 (1956).
7. Tétényi P., Tyihák E., Máthé I., Sváb J., Pharmazie, 17, 463 (1962).
8. Kirby E. C., J. Chromatogr., 80, 271 (1973).
9. Tyihák E., Vágújfalvi D., Plant. Med., 15, 269 (1967).
10. Tétényi P., Tyihák E., Máthé I., Sváb J., Pharmazie, 17, 463 (1962).
11. Gupta A. S., Dev S., J. Chromatogr., 12, 189 (1963).
12. Westfält L., Acta Chem. Scand., 18, 572 (1964).
13. Chow P. N., Motl O., Lukes V., Collect. Czech. Chem. Commun., 30, 917 (1965).
14. Lawrence B. M., J. Chromatogr., 38, 535 (1968).

15. von Schantz M., Juvonen S., Hemming R., J. Chromatogr., 20, 618 (1965).
16. Attaway J. A., Barabas L. J., Wolford R. W., Anal. Chem., 37, 1289 (1965).
17. Jaspersen-Schib R., Pharm. Acta Helv., 36, 141 (1961).
18. Jaspersen-Schib R., Flueck H. Congr. Sci. Farm. Conf. Commun., 21st, Pisa, 1961, 608 (1962).
19. Attaway J. A., Wolford R. W., 25th Intern. Symp. Gas Chromatogr., Brighton, England, September 1964.
20. Hefmánek S., Schwarz V., Cekan Z., Pharmazie, 16, 566 (1961).
21. Ito M., Wakamatsu S., Kawahara H., J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect., 75, 413 (1954); Chem. Abstr., 48, 13172 (1954).
22. Ito M., Nippon Kagaku Zasshi, 78, 172 (1957).
23. Petrowitz H.-J., Angew. Chem., 72, 921 (1960).
24. Garf E., Hoppe W., Deut. Apoth.-Ztg., 102, 393 (1962).
25. Yamamoto E., Fukurawa T., J. Fac. Educ. Hiroshima Univ., 4, 45 (1956).
26. Tyihák E., Vágújfalvi D., Hágony P. L., J. Chromatogr., 11, 45 (1963).
27. McSweeney G. P., J. Chromatogr., 17, 183 (1965).
28. Banthorpe D. V., Turnbull K. W., J. Chromatogr., 37, 366 (1968).
29. McSweeney G. P., J. Chromatogr., 17, 183 (1965).
30. Dunphy P. J., Kerr J. D., Pennock J. F., Whittle K. J., Feeney J., Biochim. Biophys. Acta, 136, 136 (1967).
31. Evans F. J., Kinghorn A. D., J. Chromatogr., 87, 443 (1973).
32. Hedin P. A., Gueldner R. C., Thompson A. C., Anal. Chem., 42, 403 (1970).
33. ter Heide R., Z. Anal. Chem., 236, 215 (1968).
34. Minyard J. P., Tumlinson J. H., Thompson A. C., Hedin P. A., J. Chromatogr., 29, 88 (1967).
35. Dhont J. H., de Rooy C., Analyst (London), 86, 527 (1961).
36. von Schantz M., Juvonen S., Oksanen A., Hakama I., J. Chromatogr., 38, 364 (1968).
37. Ikan R., J. Chromatogr., 17, 591 (1965).
38. Copius-Peereboom J. W., Z. Anal. Chem., 205, 325 (1964).
39. Cardemil E., Vicuna J. R., Jabalquinto A. M., Cori O., Biochem., 59, 636 (1974).
40. Pesnelle P., Planta Med., 12, 403 (1964).
41. Seikel M. K., Rowe J. W. Phytochemistry, 3, 27 (1964).
42. Budzynska-Topolowska J., Rutkowski A., Rev. Fr. Corps Gras., 16, 695 (1969).
43. Fedeli E., Lanazani A., Capella P., Jacini G., J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 254 (1966).
44. Wollmann H., Habicht G., Lau I., Schultz I., Pharmazie, 28, 56 (1973).
45. Katayama T., Nippon Suisan Gakkaishi, 26, 814 (1960).
46. von Schantz M., Lopmeri A., Stroemer E., Salonen R., Brunni S., Farm. Aikak., 71, 52 (1962).
47. Attaway J. A., Anal. Chem., 36, 2224 (1964).
48. Хейфиц Л. А., Молдованская Г. И., Шулов Л. М., Журн. Анал. хим., 18, 267 (1963).
49. Sundt E., Saccardi A., Food Technol., 16, 89 (1962).
50. Kahan S., Fitelson J., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 551 (1964).
51. Kratzl K., Puschmann G., Holzforchung, 14, 1 (1960).
52. Dhont J. H., Dijkman G. J. C., Analyst (London), 89, 681 (1964).
53. Onoe K., J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect., 73, 337 (1952).
54. Vashist V. N., Handa K. L., J. Chromatogr., 18, 412 (1965).
55. Lacharme J., Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, 7, 55 (1963).
56. Nano G. M., Sancin P., Ann. Chim. (Rome), 53, 677 (1963); Chem. Abstr., 59, 12189 (1963).
57. Dhont J. H., Mulders-Dijkman G. J. C., Analyst (London), 94, 1090 (1969).
58. Martelli A., Riv. Ital. Essenze, Profumi, Pianta Off. Aroma, Saponi, Cosmet., Aerosol, 53, 607 (1971).

59. Rothbaecher A., Suteu F., J. Chromatogr., 100, 236 (1974).
60. Bell A. A., Stipanovic R. D., Howell C. R., Fryxell P. A. Phytochemistry, 14, 225 (1975).
61. Klouwen M. H., ter Heide R., Parfuem Cosmet., 43, 195 (1962).
62. Wang K.-T., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), 8, 241 (1961).
63. Lin Y. T., Wang K.-T., Lin Y.-S., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), 9, 68 (1962); Chem. Abstr., 58, 9412 (1963).
64. Bakshi S. H., Krishnaswami N., J. Chromatogr., 9, 395 (1962).
65. Thieme H., Pharmazie, 22, 722 (1967).
66. Fraser H. S., Swan E. P., J. Chromatogr., 38, 141 (1968).
67. Tschesche R., Lampert F., Snatzke G., J. Chromatogr., 5, 217 (1961).
68. Huneck S., Tetrahedron, 19, 479 (1963).
69. Brieskorn C. H., Klinger H., Polonius W., Arch. Pharm., 294, 389 (1961).
70. Vioque E., Maza M. P., Grasas Aceites (Seville, Spain), 14, 9 (1963); Chem. Abstr., 59, 8986 (1963).
71. Thomas A. F., Mueller J. M., Experientia, 16, 62 (1960).
72. Bonati A., Filoterapia, 34, 19 (1963).
73. Beroza M., Jones W. A., Anal. Chem., 34, 1029 (1962).
74. Norin T., Wastfelt L., Acta Chem. Scand., 17, 1828 (1963).
75. Felix D., Melera A., Seible J., Kováts E. Sz., Helv. Chim. Acta, 46, 1513 (1963).
76. Nigam I. C., Sahasrabudhe M., Levi L., Can. J. Chem., 41, 1535 (1963).
77. Mahl B. S., Wadia M. S., Bhatia I. S., Kalsi P. S., Perfum. Essent. Oil Rec., 59, 519 (1968).
78. C. le O. Darcel, Can. J. Biochem., 46, 509 (1968).
79. Ito M., Wakamatsu S., Kawahara H., J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect., 74, 699 (1963).
80. Reitsema R. H., Anal. Chem., 26, 960 (1954).
81. Reitsema R. H., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 43, 414 (1954).
82. Reitsema R. H., Cramer F. J., Scully N. J., Chorney W., J. Pharm. Sci., 50, 18 (1961).
83. Reitsema R. H., Cramer F. J., Fass W. E., J. Agric. Food Chem., 5, 779 (1957).
84. Battaille J., Dunning R. L., Loomis W. D., Biochim. Biophys. Acta, 51, 538 (1961).
85. Battaille J., Loomis W. D., Biochim. Biophys. Acta, 51, 545 (1961).
86. Перцев И. М., Пивненко Г. П., Фарм. Журн. (Киев), 16, 28 (1961).
87. Karawya M. S., Wahba S. K., Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ., 1, 125 (1961); Chem. Abstr., 60, 13092 (1964).
88. Rothbaecher H., Crisan C., Bendoe E., Farmacia (Bucharest), 12, 733 (1964).
89. Гурвич Н. Л., Краткий отчет ВНИИ масляных и эфиромасляных культур ВАСХНИЛ, 1959, 154.
90. Nigam I. C., Levi L., J. Pharm. Sci., 53, 1008 (1964).
91. Hefendehl F. W., Arch. Pharm., 300, 438 (1967).
92. Vlahov R., Ognyanov I., Riechst., Aromen, Koerperpflagem., 17, 315 (1967).
93. Deryng J., Strzelecka H., Walewska E., Soroczyńska T., Farm. Pol., 24, 187 (1968).
94. Rigby F. L., Bethune J. L., Am. Soc. Brewing Chem. Proc., 1955, 174.
95. Kuroiwa Y., Hashimoto H., Rep. Rez. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 3, 5 (1960).
96. Kuroiwa Y., Hashimoto H., Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 3, 11 (1960).
97. Hashimoto H., Kuroiwa Y., Hakko Kogaku Zasshi, 39, 554 (1961); Chem. Abstr., 59, 2132 (1963).
98. Hashimoto H., Kuroiwa Y., Hakko Kogaku Zasshi, 39, 545 (1961).
99. Hashimoto H., Kuroiwa Y., Hakko Kogaku Zasshi, 39, 541 (1961).
100. Kuroiwa Y., Hashimoto H., J. Inst. Brewing, 67, 506 (1961).

101. *Kuroiwa Y., Kokubo E., Hashimoto H.*, Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., **4**, 41 (1961).
102. *Kuroiwa Y., Hashimoto H.*, J. Inst. Brewing, **67**, 352 (1961).
103. *Kuroiwa Y., Hashimoto M.*, J. Inst. Brewing, **67**, 347 (1961).
104. *Kuroiwa Y., Hashimoto H.*, Am. Soc. Brewing Chem. Proc., **1961**, 28.
105. *Ibid.*, **1963**, 181.
106. *Aitken R. A., Bruce A., Harris J. O., Seaton J. C.*, J. Inst. Brew. (London), **74**, 436 (1968).
107. *Aitken R. A., et al.*, J. Inst. Brew. (London), **76**, 29 (1970).
108. *Kirchner J. G., Rice R. G., Miller J. M., Keller G. J., Fox M. M.*, J. Agric. Food Chem., **1**, 510 (1953).
109. *Kirchner J. G., Miller J. M.*, J. Agric. Food Chem., **1**, 512 (1953).
110. *Kirchner J. G., Miller J. M.*, J. Agric. Food Chem., **5**, 283 (1957).
111. *Attaway J. A., Hendrick D. V., Wolford R. W.*, Proc. Florida State Hortic. Soc., **77**, 305 (1964).
112. *Peyron L.*, Compt. Rend., **257**, 235 (1963).
113. *Millet F., Monghal M. A., Rollet M., Dorche J.*, Ann. Pharm. Fr. **28**, 63 (1970).
114. *Landgraf H.*, Rev. Quim. Ind. (Rio de Janeiro), **29**, 24 (1960); Chem. Abstr., **56**, 13028 (1962).
115. *Rispoli G., Di Giacomo A., Tracuzzi M. L.*, Riv. Ital. Essenze-Profumi, Piante Off. Oli Veg. Saponi, **45**, 62 (1963).
116. *Vannier S. H., Stanley W. L.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **41**, 432 (1958).
117. *Stanley W. L., Vannier S. H.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **40**, 582 (1957).
118. *Stanley W. L., Lindwall R. C., Vannier S. H.*, J. Agric. Food Chem., **6**, 858 (1958).
119. *Stanley W. L., Ikeda R. M., Cook S.*, Food Technol., **15**, 381 (1961).
120. *Stanley W. L.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **42**, 643 (1959).
121. *Stanley W. L.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **44**, 546 (1961).
122. *Ikeda R. M., Stanley W. L., Vannier S. H., Rolle L. A.*, Food Technol., **15**, 379 (1961).
123. *D'Amore G., Calapaj R.*, Rass. Chim., **17**, 264 (1965).
124. *Cieri U. R.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **52**, 719 (1969).
125. *MacLeod W. D., Jr., Buigues N. M.*, J. Food Sci., **31**, 588 (1966).
126. *Madsen B. C., Latz H. W.*, J. Chromatogr., **50**, 288 (1970).
127. *Ikeda R. M., Stanley W. L., Rolle L. A., Vannier S. H.*, J. Food Sci., **27**, 593 (1962).
128. *Bernhard R. A.*, Nature, **182**, 1171 (1958).
129. *Martines Nadal N. G.*, Am. Perfum. Cosmet., **79**, 43 (1964).
130. *Verderio E., Venturini C.*, Bol. Chim. Farm., **104**, 170 (1965).
131. *Pozzo-Balbi T., Nobile L.*, Ann. Chim. (Rome), **60**, 171 (1970).
132. *Karawya M. S., Balbaa S. I., Hifnawy M. S.*, J. Pharm. Sci., **60**, 361 (1971).
133. *Attaway J. A., Pieringer A. P., Barabas L. J.*, Phytochemistry, **5**, 141 (1966).
134. *Maier V. P., Grant E. R.*, J. Agric. Food Chem., **18**, 250 (1970).
135. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **24**, 205 (1958).
136. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **24**, 346 (1958); Chem. Abstr., **53**, 11532 (1959).
137. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **21**, 412 (1955); Chem. Abstr., **50**, 13184 (1956).
138. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **21**, 416 (1956).
139. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **21**, 412 (1955).
140. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **27**, 75 (1961); Chem. Abstr., **56**, 7710 (1962).
141. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **24**, 925 (1959); Chem. Abstr., **57**, 15512 (1962).

142. *Katayama T.*, Nippon Suisan Gakkaishi, **21**, 425 (1955); Chem. Abstr., **50**, 13184 (1956).
143. *Vágújfalvi D., Tyihák E.*, Herba Hung., **2**, 361 (1963).
144. *Lawrence B. M.*, Perfum. Essent. Oil Rec., **59**, 421 (1968).
145. *Petrowitz H.*, Riechst., Aromen, Koerperlegem., **16**, 345 (1966).
146. *Calvarano I.*, Essenz. Deriv. Agrum., **35**, 212 (1965).
147. *Vágújfalvi D., Tyihák E., Held G.*, Herb. Hung., **8**, 155 (1969).
148. *Vágújfalvi D., Tyihák E., Held G.*, Herb. Hung., **9**, 79 (1970).
149. *Vágújfalvi D., Tyihák E., Held G.*, Herb. Hung., **9**, 135 (1970).
150. *Montes A. L.*, An. Asoc. Quim. Arg., **40**, 273 (1952).
151. *Gaenshirt H.*, Pharm. Ind., **15**, 177 (1953).
152. *Gruener S., Spaich W.*, Arch. Pharm., **287/59**, 243 (1954).
153. *Coveney R. D., Matthews W. S. A., Pickering G. B.*, Colonial Plant Animal Prod., **5**, 150 (1955).
154. *Kaiser H. H.*, Dissertation, Karlsruhe, 1955.
155. *Garcia de Nadal N.*, Am. Perfum. Essent. Oil Rev., **65**, 17 (1955).
156. *Wotherspoon P. A., Bedoukian P. Z.*, Am. Perfum. Essent. Oil Rev., **66**, 17 (1955).
157. *Demole E.*, Compt. Rend., **243**, 1883 (1956).
158. *Onishi I., Tomita H., Fukuzumi T.*, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **20**, 61 (1956).
159. *Stahl E., Schroeter G., Kraft G., Renz R.*, Pharmazie, **11**, 633 (1956).
160. *Allentoff N., Wright F. G.*, Can. J. Chem., **35**, 900 (1957).
161. *Frydman B. J., Montes A. L., Troparevsky A.*, An. Asoc. Quim. Agr., **45**, 248 (1957); Chem. Abstr., **52**, 17622 (1958).
162. *Frydman B. J., Montes A. L., Troparevsky A.*, An. Asoc. Quim. Arg., **45**, 257 (1957).
163. *Frydman B. J., Montes A. L., Troparevsky A.*, An. Asoc. Quim. Arg., **45**, 261 (1957).
164. *Garcia de Martinez Nada N.*, Am. Perfum. Aromat., **69**, 27 (1957).
165. *Gogroef G.*, Pharmazie, **12**, 38 (1957).
166. *Onishi I., Tomita H., Fukuzumi T.*, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **21**, 239 (1957).
167. *Yamamoto K., Furukawa T.*, J. Fac. Educ., Hiroshima Univ., **5**, 53 (1957).
168. *Yamamoto K., Furukawa T., Matsukura M.*, J. Fac. Educ. Hiroshima Univ., **5**, 77 (1957).
169. *Demole E., Lederer E.*, Bull. Soc. Chim. Fr., **1958**, 1128.
170. *Klohr-Meinhardt R.*, Planta Med., **6**, 203 (1958).
171. *Ibid.*, p. 208.
172. *Lederer E.*, Accad. Naz. Lincei, Fondazione Donegani, Conso Estivo Chim., **3**, Varenna, Italy, September 23—October 7, 1959, pp. 117—131.
173. *Onishi I.*, Nippon Senbai Kosha Kenkyusho Kenkyu Hokoku, No. 163, **19**, p. (1958).
174. *Pryor L. D., Bryant L. H.*, Proc. Linnean Soc. N. S. Wales, **83**, 55 (1958).
175. *Stahl E.*, Chem.-Ztg., **82**, 323 (1958).
176. *Stahl E.*, Parfuem. Kosmet., **39**, 564 (1958).
177. *Suga T.*, Chem. Soc. Japan, **31**, 569 (1958).
178. *Katayama T., Nagai I.*, J. Fac. Fisheries Animal Husb., Hiroshima Univ., **2**, 349 (1959).
179. *Katayama I., Nagai T.*, J. Fac. Fisheries Animal Husb., Hiroshima Univ., **2**, 355 (1959).
180. *Winkler W., Lanau E.*, Pharm. Ztg. **104**, 1407 (1959).
181. *Akazawa T.*, Arch. Biochem. Biophys., **90**, 82 (1960).
182. *Akazawa T., Uritani I.*, Arch. Biochem. Biophys., **88**, 150 (1960).
183. *Brieskorn C.-H., Wenger E.*, Arch. Pharm., **293/65**, 21 (1960).
184. *Gallardo I., Montes A. L.*, An. Asoc. Quim. Arg., **48**, 108 (1960); Chem. Abstr., **55**, 23934 (1961).

185. Fujita K., J. Sci. Hiroshima Univ., **A24**, 691 (1960); Chem. Abstr., **56**, 6004 (1962).
186. Lederer E., Fr. Parfums, **3**, 28 (1960).
187. Marbet R., Saucy G., Chimia (Aarau), **14**, 362 (1960).
188. Tétényi P., Pharmazie, **16**, 273 (1960).
189. Wulff H. D., Stahl E., Naturwissenschaften, **47**, 114 (1960).
190. Akazawa T., Wada K., Agric. Biol. Chem. (Tokyo), **25**, 30 (1961).
191. Hoerhammer L., Wagner H., Lay B., Pharm. Ztg., **106**, 1308 (1961).
192. Kartzl K., Holz Roh-Werkst., **19**, 219 (1961).
193. Neubern de Toledo T., Wasicky R., Tribuna Farm. (Brazil), **29**, 44 (1961).
194. Paris R., Godon M., Ann. Pharm. Fr., **19**, 86 (1961).
195. Zanini C., Pozzo A. D., Dansi A., Boll. Chim. Pharm., **100**, 83 (1961).
196. Akazawa T., Uritani I., Akazawa Y., Arch. Biochem. Biophys., **99**, 52 (1962).
197. Brieskorn C. H., Polonius W., Pharmazie, **17**, 705 (1962).
198. Deshusses J., Gabbai A., Mitt. Geb. Lehensm. Hyg., **53**, 408 (1962).
199. El-Deeb S. R., Karawya M. S., Wahba S. K., J. Pharm. Sci. U. Arab Rep., **3**, 81 (1962).
200. Gabel E., Mueller K. H., Schoknecht I., Dtsch. Apoth.-Ztg., **102**, 293 (1962).
201. Hoerhammer L., Wagner H., Dtsch. Apoth.-Ztg., **102**, 733 (1962).
202. Huneck S., J. Chromatogr., **7**, 561 (1962).
203. Huneck S., Lehn J.-M., Bull. Soc. Chim. Fr., **1963**, 1702.
204. Huneck S., Lehn J.-M., Bull. Soc. Chim. Fr., **1963**, 321.
205. Jaspersen-Schib R., Flueck H., Boll. Chim. Farm., **101**, 512 (1962).
206. Jork H., Chromatogr. Symp., 2nd, Brussels, **1962**, 213.
207. Lavie D., Glotter E., Shvo Y., Tetrahedron, **19**, 1377 (1963).
208. Morgan M. E., Pereira R. L., J. Dairy Sci., **45**, 457 (1962).
209. Nigam S. S., Kumari G. L., Perfum. Essent. Oil Record, **53**, 529 (1962).
210. Перцев И. М., Пивненко Г. П., Фарм. журн. (Киев), **17**, 35 (1962).
211. Scheidegger U., Schaffner K., Jeger O., Helv. Chim. Acta, **45**, 400 (1962).
212. Schreider K., Osske G., Kulturpflanze, **10**, 372 (1962).
213. Schulte K. E., Congr. Sci. Farm. Conf. Commun., 21st, Pisa, **1961** (Publ. 1962), 798.
214. Tyihak E., Vágúfalvi D., Herba Hung., **1**, 97 (1962).
215. Bhraramamba A., Sidhu G. S., Perfum. Essent. Oil Rec., **54**, 732 (1963).
216. Borkowski B., Pasich B., Farm. Pol., **19**, 435 (1963).
217. Brud W., Daniewski W., Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 753 (1963).
218. Capella P., Fedeli E., Cirimele M., Lenzani A., Jacini G., Riv. Ital. Sostanze Grasse, **40**, 645 (1963); Chem. Abstr., **61**, 4971 (1964).
219. Djerassi C., Schneider R. A., Vorbrueggen H., Allinger N. L., J. Org. Chem., **28**, 1632 (1963).
220. Fu F.-Y., Hsu T.-P., Li M.-T., Shang T.-M., Fang C.-N., Yao-Hsueh Hsueh Pao, **10**, 618 (1963); Chem. Abstr., **60**, 1485 (1964).
221. Grab R., Dtsch. Apoth.-Ztg., **103**, 1424 (1963).
222. Graham C. L., McQuillin F. J., J. Chem. Soc., **1963**, 4634.
223. Hoerhammer L., Wagner H., Eyrieh W., Z. Naturforsch., **18b**, 639 (1963).
224. Hoerhammer L., Wagner H., Dtsch. Apoth.-Ztg., **103**, 429 (1963).
225. Hoerhammer L., Wagner H., Seitz M., Dtsch. Apoth.-Ztg., **103**, 1302 (1963).
226. Ikan R., Kashman J., Israel J. Chem., **1**, 502 (1963).
227. Ikan R., Kashman J., Harel S., Bergmann E. D., Israel J. Chem., **1**, 248 (1963).
228. Kaufmann H. P., Sen Gupta A. K., Chem. Ber., **96**, 2489 (1963).
229. Mangoni L., Belardini M., Ric. Sci. Rend., **3**, 528 (1963); Chem. Abstr., **59**, 15330 (1963).
230. Paris R., Godon M., Recherches (Paris), **13**, 48 (1963).
231. Pasich B., Diss. Pharm., **15**, 73 (1963); Chem. Abstr., **59**, 13111 (1963).
232. Peyron L., Chim. Anal. (Paris), **45**, 186 (1963).

233. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 97 (1963).
234. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 316 (1963).
235. von Schantz M., Eripainos Farm. Aikak., **3**, 95 (1963).
236. Schulte K. E., Ahrens F., Sprenger E., Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg., **108**, 1165 (1963).
237. Смир В. А., Семеновский А. В., Кучеров В. Ф., Изв. АН СССР, Сер. хим., **1963**, 1601.
238. Tschesche R., Axen U., Snatzke G., Ann. Chem., **669**, 171 (1963).
239. Tschesche R., Henckel E., Snatzke G., Tetrahedron Lett., **1963**, 613.
240. Tyihak E., Sárkányi-Kiss I., Máthe J., Pharm. Zentralhalle, **102**, 128 (1963).
241. Vorbrueggen H., Pakrashi S. C., Djerassi C., Ann. Chem., **668**, 57 (1963).
242. Wellendorf M., Dansk. Tidsskr. Farm., **37**, 145 (1963).
243. Bergstroem G., Lagercrantz C., Acta Chem. Scand., **18**, 560 (1964).
244. Demole E., "La Chromatographie sur Couches Minces dans le Domaine des Substances Odorantes Naturelles et Synthétiques", in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettólo Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 45.
245. Demole E., Helv. Chim. Acta, **47**, 319 (1964).
246. Hoerhammer L., Hamidi E. A., Richter G., J. Pharm. Sci., **53**, 1033 (1964).
247. Hoerhammer L., Wagner H., Richter G., Koenig H. W., Heng I., Dtsch. Apoth.-Ztg., **104**, 1398 (1964).
248. Ikan R., Kashman J., Bergmann E. D., J. Chromatogr., **14**, 275 (1964).
249. Kaufmann H. P., San Gupta A. K., Fette, Seifen, Anstrichm., **66**, 461 (1964).
250. Kohen F., Patnaik B. K., Stevenson R., J. Org. Chem., **29**, 2710 (1964).
251. Kunovits G., Seifen-Oele-Fette-Wachse, **90**, 895 (1964).
252. Masse J., Paris R., Ann. Pharm. Fr., **22**, 349 (1964).
253. Moreira E. A., Cecy C., Trib. Farm. (Brazil), **32**, 55 (1964).
254. Nano G. M., Martelli A., Gazz. Chim. Ital., **94**, 816 (1964).
255. Schilcher H., Dtsch. Apoth.-Ztg., **104**, 1019 (1964).
256. Shalaby A. F., Richter G., J. Pharm. Sci., **53**, 1502 (1964).
257. Stahl E., Arch. Pharm., **297**, 500 (1964).
258. Takeda K., Minato H., Ishikawa M., J. Chem. Soc., **1964**, 4578.
259. Takeda K., Minato H., Ishikawa M., Miyawaki M., Tetrahedron, **20**, 2655 (1964).
260. Tschesche R., Biernoth G., Snatzke G., Ann. Chem., **674**, 196 (1964).
261. Vernin G., Fr. Parfums, **7**, 299 (1964).
262. Wasicky R., Rev. Fac. Bioquim. (S. Paulo), **1**, 69 (1963).
263. Wollrab V., Riechst., Aromen, **14**, 321 (1964).
264. Zinkel D. F., Rowe J. W., J. Chromatogr., **13**, 74 (1964).
265. Betts T. J., J. Pharm. Pharmacol., **17**, 520 (1965).
266. Bhatnagar V. M., Perfum. Essent. Oil Rec., **56**, 374 (1965).
267. Blanc P., Bertrand P., Saqui-Sannes G. D. E., Lescure R., Chim. Anal. (Paris), **47**, 354 (1965).
268. Elgamal H. A., Fayez M. B. E., Z. Anal. Chem., **211**, 190 (1965).
269. Ikan R., Meir R., Israel J. Chem., **3**, 117 (1965).
270. Kraus L., Perenyi F., Cesk. Farm., **14**, 423 (1965).
271. Martin G. E., Schmit J. A., Schoeneman R. L., J. Assoc. Off. Agric. Chem., **48**, 962 (1965).
272. Moslé H. G., Wolfe W., Bode W., Z. Anal. Chem., **207**, 24 (1965).
273. Murakami T., Itokawa H., Uzuki F., Sawada N., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **13**, 1346 (1965).
274. Nano G. M., Biglino G., Martelli A., Sancin P., Atti Accad. Sci. Torino, **99**, 1 (1965).
275. Nigam M. C., Nigam I. C., Levi L., J. Soc. Cosmet. Chem., **16**, 155 (1965).
276. Пазешниченко В. А., Гусева А. П., Прикл. биохим. микробиол., **1**, 559 (1965).

277. *Schultz O. E., Mohrmann H. L.*, Pharmazie, **20**, 379 (1965).
278. *Verderio E., Venturini D.*, Riv. Ital. Essenze-Profumi, Pianta Off. Oli. Vag. Saponi, **47**, 430 (1965).
279. *Wrolstad R. E., Jennings W. G.*, J. Chromatogr., **18**, 318 (1965).
280. *Zacsko-Szasz M., Szasz G.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **67**, 332 (1965).
281. *El-Hamidi A., Ahmed S. S.*, Pharmazie, **21**, 438 (1966).
282. *Голя В. Т.*, Биохим. прогр. технол. чайн. произв., АН СССР, Инст. биохимии, **1966**, 57.
283. *Munoz Teran O.*, Rev. Fac. Quim. Farm., **5**, 67 (1966).
284. *Neves M. T. C., Cardoso Do Vale J., Neves A. C.*, Garcia Orta, **14**, 431 (1966).
285. *Proenca Da Cunha A.*, Garcia Orta, **14**, 411 (1966).
286. *Zacsko-Szasz M., Szasz G.*, Herba Hung., **5**, 91 (1966).
287. *Barua A. K., Dutta S. P., Pal S. K., J. Chromatogr.*, **31**, 569 (1967).
288. *Deryng J., Strzelecka H., Walewska E., Soroczynska T.*, Farm. Pol., **23**, 32 (1967).
289. *Domagalina E., Zareba S.*, Diss. Pharm. Pharmacol., **19**, 391 (1967).
290. *Foks J.*, Zesz. Nauk. Politech. Gdansk., Chem., **17**, 35 (1967).
291. *Martelli A., Nano G. M., Biglino G., Gallino M.*, Ann. Chem. (Rome), **57**, 1027 (1967).
292. *Pakrashi S. C., Majumdar P.*, Indian J. Chem., **5**, 129 (1967).
293. *Tóth L.*, Planta Med., **15**, 371 (1967).
294. *Adcock J. W., Betts T. J.*, J. Chromatogr., **34**, 411 (1968).
295. *Challen S. B., Kučera M.*, J. Chromatogr., **32**, 53 (1968).
296. *Lebez D.*, J. Chromatogr., **33**, 544 (1968).
297. *Sticher O., Flueck H.*, Pharm. Acta Helv., **48**, 411 (1968).
298. *Tyhiák E., Behassy S., Jahasz K.*, IV Междунар. конгр. по эфирн. маслам, 1968, Материалы, **1**, 351 (1971).
299. *Waisser K., Zelinka J., Vystrčil A.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **33**, 2485 (1968).
300. *Bauer L., Brasil e Silva G. A. A.*, Trib. Farm., **37**, 151 (1969).
301. *Jain S. R.*, Planta Med., **17**, 230 (1969).
302. *Kami T., Otaishi S., Hayashi S., Matsuura T.*, Agric. Biol. Chem. (Tokyo), **33**, 502 (1969).
303. *Pensar G.*, Suom. Kemistiseurantied., **78**, 11 (1969).
304. *Stahl W. H., Skarzynski J. N., Voelker W. A.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **52**, 1184 (1969).
305. *Бабкин В. А., Дубовенко Ж. В., Пентегова В. А.*, Изв. Сиб. отд. АН СССР, сер. хим., **1970**, № 2, вып. 1, 168.
306. *El-Hamidi A., Sidrak I.*, Planta Med., **18**, 98 (1970).
307. *Halim A. F., Collins R. P.*, Lloydia, **33**, 7 (1970).
308. *Jonczyk J.*, Acta Pol. Pharm., **27**, 301 (1970).
309. *Karawya M. S., Balbaa S. I., Hifnawy M. S. M.*, Amer. Perfum. Cosmet., **85**, 23 (1970).
310. *Rao B. G. V. N., Nigam S.*, Indian Perfum., **14**, 4 (1970).
311. *Sinsheimer J. E., Rao G. S., McIlhenny H. M.*, J. Pharm. Sci., **59**, 622 (1970).
312. *Vandeburg L. E., Wilder E. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **47**, 514 (1970).
313. *Collins R. P., Halim A. F.*, Planta Med., **20**, 241 (1971).
314. *Griffin W. J., Parkin J. E.*, Planta Med., **20**, 97 (1971).
315. *Jeanes A., Tetau M.*, Plant Med. Phytother., **5**, 214 (1971).
316. *Meisinger A.*, Apothekerprakt. Pharm. Tech. Assist., **17**, 41 (1971).
317. *Poplawski J., Holub M., Samek Z., Herout V.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **36**, 2189 (1971).
318. *Shah C. S., Qadry J. S., Chauhan M. G.*, J. Pharm. Pharmacol., **23**, 448 (1971).
319. *Thapa R. K., Vashist V. N., Atal C. K., Gupta R.*, Planta Med., **20**, 67 (1971).
320. *Connell D. W., McLachlan R.*, J. Chromatogr., **67**, 29 (1972).
321. *Drozd B., Grabarczyk H., Samek Z., Holub M., Herout V., Sorm F.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **37**, 1546 (1972).
322. *Herisset A., Jolivet J., Rey P.*, Plant. Med. Phytother., **6**, 137 (1972).
323. *ter Heide R.*, J. Agric. Food Chem., **20**, 747 (1972).
324. *Mancini B., Rubino C. L., Pozetti G. L., Mancini M. A. D.*, Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara, **6**, 41 (1972).
325. *Popescu H., Ciupe R.*, Chim. Anal. (Bucharest), **2**, 168 (1972).
326. *Qedan S.*, Planta Med., **21**, 410 (1972).
327. *Reucker G.*, Arch. Pharm. (Weinheim), **305**, 486 (1972).
328. *Rueedi P., Engster C. H.*, Helv. Chim. Acta, **55**, 1994 (1972).
329. *Schulcher H.*, Dtsch. Apoth.-Ztg., **112**, 1497 (1972).
330. *Willuhn G.*, Planta Med., **21**, 329 (1972).
331. *Ardon A., Nakano T.*, Planta Med., **23**, 348 (1973).
332. *Balbaa S. I., Hilal S. H., Haggag M. Y.*, Planta Med., **23**, 312 (1973).
333. *Chauhan V. S., Sriram N., Subramanian G. B. V., Singh H.*, J. Chromatogr., **84**, 51 (1973).
334. *Habib A.-A., Metwally A. M.*, Planta Med., **23**, 88 (1973).
335. *Hoelzl J., Demuth G.*, Dtsch. Apoth.-Ztg., **113**, 671 (1973).
336. *Holub M., Samek Z.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **38**, 731 (1973).
337. *Morales J. C., Torres E. G.*, Seifen-Oele-Fette-Wachse, **99**, 17 (1973).
338. *Salehian A., Netien G.*, Trav. Soc. Pharm. Montp., **33**, 329 (1973).
339. *Sengupta P., Sen A. R., Bose A., Mathew T. V.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 1510 (1973).
340. *Tirimanna A. S. L.*, Microchem. Acta, **1973**, 9.
341. *Blechinger F. W.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **76**, 275 (1974).
342. *Bungeri-Hansing I., Jork H.*, Z. Anal. Chem., **268**, 203 (1974).
343. *Dro A. S., Hefendeht F. W.*, Arch. Pharm., **307**, 168 (1974).
344. *Kaempf R., Steinegger E.*, Pharm. Acta Helv., **49**, 87 (1974).
345. *Karawya M. S., Hifnawi M. S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **57**, 997 (1974).
346. *Lichtenstein E. P., Liang T. T., Schulz K. R., Schoes H. K., Carter G. T.*, J. Agric. Food Chem., **22**, 658 (1974).
347. *Mesonero M., Cabo Torres J., Villar del Fresno A.*, Boll. Chim. Farm., **113**, 131 (1974).
348. *Sen A. R., Sengupta P., Mondal A., Roy B. R.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **57**, 763 (1974).
349. *Thieme H., Hartmann U.*, Pharmazie, **29**, 50 (1974).
350. *Banerji R., Mitra C. R.*, Planta Med., **28**, 52 (1975).
351. *Briggs L. H., White G. H.*, Tetrahedron, **31**, 1311 (1975).
352. *Budzikiewicz H., Roemer A.*, Tetrahedron, **31**, 1761 (1975).
353. *Elgamal M. H. A., El-Tawil B. A. H.*, Planta Med., **27**, 159 (1975).
354. *Haggag M. Y., Shalaby A. S., Verser-Petri G.*, Planta Med., **27**, 361 (1975).
355. *Hoelzl J., Demuth G.*, Planta Med., **27**, 37 (1975).
356. *Hoelzl J., Franz C., Fritz D., Voemel A.*, Z. Naturforsch., **30**, C. Biosci., **853** (1975).
357. *Ivie G. W., Witzel D. A., Rushing D. D.*, J. Agric. Food Chem., **23**, 845 (1975).
358. *Nambudiri E. S., Mathew A. G., Krishnamurthy N., Lewis Y. S.*, Int. Flavours Food Addit., **6**, 135 (1975).
359. *Рустембекова Г. Б., Горяев М. И., Кротова Г. И., Дембицкий А. Д.*, Изв. АН КазССР, сер. хим., **25**, 32 (1975).
360. *Stipanovič R. D., Bell A. A., Howell C. R.*, Phytochemistry, **14**, 1809 (1975).
361. *Stipanovič R. D., Bell A. A., Mace M. E., Howell C. R.*, Phytochemistry, **14**, 1077 (1975).
362. *Biering W. E., Bungert-Hansing I., Jork H.*, Planta Med., **29**, 133 (1976).
363. *Verzar-Petri G., Marczal G., Lemberkovics E.*, Pharmazie, **31**, 256 (1976).



1. ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Витамин А и родственные соединения

Некоторые из ранних работ по ТСХ посвящены определению содержания витамина А и каротина в пищевых жирах и маслах [1, 2]. Планта и др. [3] хроматографировали в силикагеле различные изомеры витаминов А и А<sub>2</sub>. Кацуи и др. [4] опубликовали данные по разделению витамина А и ряда его производных (кислоты, альдегида, эфиров различных жирных кислот) на силикагеле G и оксиде алюминия при элюировании бензолом или хлороформом. Величины R<sub>f</sub> этих соединений даны в табл. 31.1. Давидек и Блатна [5] определили величины R<sub>f</sub> ряда жирорастворимых витаминов, в том числе витамина А и α- и β-каротинов на незакрепленных слоях оксида алюминия (табл. 31.2). Для обнаружения пятен этих соединений они элюировали одну и ту же пластинку 70 %-ной хлорной или 98 %-ной серной кислотой под прямым углом к направлению первоначального элюирования.

Варма и др. [6] анализировали на закрепленных слоях оксида алюминия содержащиеся в рыбной печени изомеры витамина А и специально приготовленные жидкие поливитаминные составы. Величины R<sub>f</sub>, полученные при элюировании несколькими растворителями, приведены в табл. 31.3. Джон и др. [7] хроматографировали на слоях силикагеля подобную группу соединений, а также некоторые 5,6-моноэпоксипроизводные витамина А. Элюирование проводили на расстоянии 16—18 см 6 %-ным раствором ацетона в петролейном эфире (40—60°C) или 15 %-ным раствором диэтилового эфира в петролейном эфире, или 3 %-ным раствором ацетона в изооктане. Кузнецова и Ковалева [8] разделили на слоях оксида алюминия витамин А и эфиры витамина А и ряда кислот, элюируя пробы хлороформом. После определения положения пятен в УФ-свете эти пятна элюировали с пластинки ацетоном, проводили реакцию с дихлоргидрином глицирина и определяли анализируемые соединения колориметрически. Во избежание окисления разделение осуществляли в инертной атмосфере.

Еремина [9] применила оксид алюминия с 8 %-ным содержанием воды для разделения витамина А, его альдегида и пальмитата, а также β-каротина. Элюирующим растворителем

Таблица 31.1

Величины R<sub>f</sub> × 100 и цветные реакции витамина А и его производных [4]<sup>a</sup>

Соединение	Силикагель G		Оксид алюминия G		Цветная реакция с			Чувствительность при обработке SbCl <sub>5</sub>
	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>		SbCl <sub>5</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HClO <sub>4</sub>	
	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	CHCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	CHCl <sub>3</sub>				
Витамин А (спирт)	8	22	8	28	Синяя	Синяя	Красно-фиолетовая	0,1
Ацетат витамина А	41	69	62	78	"	"	Фиолетовая	0,1
Пальмитат витамина А	75	94	74	82	"	"	"	0,1
Бензоат витамина А	63	88	66	78	"	Сине-фиолетовая	"	
Триметоксibenзоат витамина А	15	35	38	76	"	То же	"	
Сенеционат витамина А	57	82	65	78	"	"	"	
Пивалат витамина А	61	84	66	78	"	Фиолетовая	"	
Альдегид витамина А	18	38	35	68	Темно-синяя	"	"	0,05
Кислотная форма витамина А	0	0	0	0	Красно-фиолетовая	Красная → красно-фиолетовая	Красно-фиолетовая	0,2
Метилловый эфир кислотной формы витамина А	50	72	66	81	Фиолетовая	То же	То же	0,2
β-Каротин	100	100	78	86	Зелено-синяя	Синяя	Синяя	0,05

<sup>a</sup> Перевод на английский язык любезно представлен Г. Кацуи

Таблица 31.2

Величины  $R_f \times 100$  ряда жирорастворимых витаминов, полученные в различных растворителях на незакрепленных слоях оксида алюминия [5] <sup>а, б</sup>

Растворитель	Каротин		Витамин					
	$\alpha$	$\beta$	A	D <sub>2</sub>	E	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
Метанол	76		78	80	81	78	71	93
Безводный этанол	87		71	91	98	89	84	91
n-Бутанол	90	89	90	93	91	92	91	92
Бензиловый спирт	90	89	89	98	92	89	92	93
Гексан	93		90	79	90	85	85	80
Циклогексан	92		88	98	100	90	94	98
Петролейный эфир	75	64	24	5	5	31	21	29
Бензин	59	50	13	0	0	21	11	10
Бензол	87		91	24	93	94	88	74
Толуол	88		91	17	69	90	88	71
Ксилол	89		91	12	72	91	87	72
Хлороформ	94		93	58	87	94	95	92
Тетрахлорид углерода	95	90	63	9	54	74	70	49

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 30 см.

при этом служила смесь петролейный эфир—ацетон—этанол (94:4:2). Адамский и Добруцкий [10] определяли содержание пальмитата витамина А в мазях, хроматографируя их на оксиде алюминия смесью бензол—циклогексан (1:2) с добавкой бутилированного окситолуола для ингибирования окисления. Чтобы провести количественное определение, витамин элюировали с пластинки циклогексаном и измеряли поглощение элюата при 325—328 нм.

Людвиг и Фреймут [11] определяли содержание витаминов А, D и E в лекарственных препаратах, проводя омыление жировых сред этих составов и затем разделяя экстрагированный продукт на солях силикагеля. Количественное определение они вели спектрофотометрически. Колева и др. [12] определяли витамины А, E и D<sub>2</sub> в лекарственных составах, хроматографируя их на силикагеле DG смесью циклогексан—диэтиловый эфир (4:1) в камере с насыщенной атмосферой. После обнаружения витаминов D и A 22 %-ным раствором трихлорида сурьмы в хлороформе, а  $\alpha$ -токоферола реактивом на основе сульфата церия они проводили прямую денситометрию пятен. Бачик и др. [13] разделяли витамины А, D<sub>3</sub> и E многократным элюированием хлороформом на силикагеле.

Таблица 31.3

Величины  $R_f \times 100$  ( $\pm 5\%$ ) витамина А и родственных соединений [6] <sup>а</sup>

Соединение	Циклогексан	Циклогексан с					
		5 % бен-зола	0,25 % ме-танола	1 % мета-нола	3 % ме-танола	3 % эта-нола	8 % эта-нола
Дегидровитамин А <sub>1</sub>	63	90	97				
$\beta$ -Каротин	6	80					
Ацетат <i>ретро</i> -витамина А <sub>1</sub>	0	36	90				
Ацетат витамина А <sub>1</sub>		19	88				
Альдегид витамина А <sub>1</sub>		0	66				
Альдегид витамина А <sub>2</sub>			59	100			
<i>ретро</i> -Витамин А <sub>1</sub> (спирт)			12	36	42		
Витамин А <sub>1</sub> (спирт)			6	16	28	45	
Эпоксид витамина А <sub>1</sub>			3	12		32	
Витамин А <sub>2</sub> (спирт)			0	8	26	28	58
Кислотная форма витамина А <sub>1</sub>				0		0	5

<sup>а</sup> С разрешения авторов и American Chemical Society.

Джонсон и Виккерс [14] разработали методику идентификации и полуколичественного определения витамина А, его ацетата и пальмитата, витамина D<sub>2</sub> (эргокальциферола), витамина D<sub>3</sub> (холекальциферола),  $\alpha$ -токоферола и его ацетата, а также добавок антиоксидантов, входящих в состав лекарственных веществ и кормов для животных. В результате разделения на силикагеле смесью n-гексан—метилэтилкетон—ди-n-бутиловый эфир (34:7:6) получены следующие величины  $R_f$ : пропиловый, октил- и додецилгаллат 0; гидрохинон 0,03; витамин А (спирт) 0,17; витамин D<sub>2</sub> 0,22; витамин D<sub>3</sub> 0,22; провитамин D<sub>2</sub> 0,30; провитамин D<sub>3</sub> 0,30; 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол 0,75; 2-*трет*-бутил-4-метоксифенол 0,32; этоксиин 0,42;  $\alpha$ -токоферол 0,51; ацетат витамина А 0,58; ацетат  $\alpha$ -токоферола 0,66; дегидровитамин А 0,81; пальмитат витамина А 0,85 и  $\beta$ -каротин 0,88. Для обнаружения пятен применяли реактив Т-121, с помощью которого обнаруживали все перечисленные соединения, кроме

ацетата токоферола; последний обнаруживали с помощью модифицированного кислотного реактива: таким способом можно обнаружить  $\alpha$ -токоферол без предварительного гидролиза. Поскольку витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> хроматографически не разделяются, отделяли растворитель от витаминов при комнатной температуре в токе азота, растворяли в пробирке остаток в 0,1 мл ледяной уксусной кислоты, добавляли 2 мл 72 %-ной хлорной кислоты (**Внимание!** Обращаться осторожно, избегать сильных восстанавливающих реагентов!) и грели смесь на водяной бане примерно 1 мин при 70°C, после чего ее охлаждали, взбалтывая вместе с 1 мл хлороформа. Витамин D<sub>2</sub> дает при этом красную или пурпурную окраску, а витамин D<sub>3</sub> — зеленовато-желтую окраску. Этому определению мешает присутствие витамина А. Анализируемые витамины были защищены от действия света, а чтобы избежать окисления, к растворителю — циклогексану добавляли триэтиламин в соотношении 1:9 и этот раствор наносили на пластинку. После элюирования растворитель испаряли током холодного воздуха и сразу же после этого опрыскивали пластинки.

Ханевальд и др. [15], чтобы снизить вероятность разложения витамина D в процессе его определения, добавляли к раствору этого витамина 0,01 % сквалена и 0,01 % бутилированного окситолуола, а к элюирующему растворителю 0,01 % бутилированного окситолуола. Кузнецова и Ковалева [16] разделяли компоненты витамина А в камере, заполненной инертным газом. Зиль и Де-Люка [17] указали, что при разделении компонентов витамина А в колонках с кремневой кислотой необходимо во избежание окисления вводить добавку антиоксиданта (они применяли *dl*- $\alpha$ -токоферол). Без этого выход падал от строго количественного до 48—60 %. Элюируя витамины на слоях силикагеля бензолом с 10 % метанола и бензолом без добавок, они разделили полностью *транс*-ретиновую кислоту, полностью *транс*-витамин А, полностью *транс*-ретинол, ацетат полностью *транс*-витamina А, 9,13-*цис*-метилретиноат, полностью *транс*-метилретиноат, 13-*цис*-метилретиноат и некоторые другие неидентифицированные изомеры, поглощающие при 362—363 нм. Для всех этих соединений указаны коэффициенты поглощения. Адамский и др. [18] нашли, что наиболее эффективное разделение продуктов деструкции пальмитата витамина А достигается на слоях неактивированного силикагеля при элюировании смесью циклогексан—петролейный эфир—диэтиловый эфир (7:3:1). Ввиду того что витамин А чувствителен к пероксидам, в эфире их не должно быть.

Кифер и Джонсон [20] разделяли ретинол (витамин А), ретиналь, ацетат ретинола и некоторые близкие им каротиноиды на гидроксиде магния, используя как элюирующие растворители

сероуглерод, тетрагидрид углерода и бензол, а также некоторые другие растворители. Перишиц-Яньиц и др. [21] хроматографировали растворимые в жирах витамины (ацетат и пальмитат ретинола, витамины К<sub>1</sub>, К<sub>3</sub>, К<sub>4</sub>, К<sub>5</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, Е и ацетат витамина Е), применяя хроматографию с обращенными фазами на слоях крахмала, целлюлозы и талька, пропитанных парафиновым маслом. На этих трех подложках получены сравнимые относительные величины R<sub>f</sub>. В указанных условиях нельзя разделить витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>, а ацетат витамина А располагается очень близко к пятнам этих двух соединений, однако его можно отличить по окраске, если обработать пластинку пентахлоридом сурьмы. Ропте и Гу [22] разделили витамин А (спирт), витамин D и  $\alpha$ -токоферол на силикагеле G, пропитанном жидким парафиновым или касторовым маслом, элюируя смесью ацетон—вода (4:1). На слоях, пропитанных касторовым (но не парафиновым) маслом получено количественное разделение. Рихтер и Ропте [23] использовали полиэтиленгликоль в качестве жидкой фазы при распределительной хроматографии, проводя разделение витаминов А, D и Е смесью петролейного эфира (30—50°C) и бензола (1:1).

### Витамин D

Давидек и Блатна [5, 24] исследовали хроматографические характеристики витамина D<sub>2</sub>, элюируя его различными растворителями на незакрепленных слоях оксида алюминия. Полученные величины R<sub>f</sub> приведены в табл. 31.2. Пятна на хроматограммах обнаруживали 75 %-ной хлорной или 98 %-ной серной кислотой.

Какач и др. [25] разделяли витамины А, D и Е также на незакрепленных слоях оксида алюминия, элюируя их толуолом, хлороформом или ксилолом. Для количественных определений они проводили спектрофотометрический анализ элюата в видимой или УФ-области.

Норман и Де-Люка [26] хроматографировали на силикагеле с несколькими элюирующими растворителями витамин D и родственные соединения. Перед употреблением они активировали пластинки не менее 16 ч при 140°C. Приготовленные таким образом пластинки использовали для исследования соединений, образовавшихся во время облучения эргостерина или 7-дегидрохолестерина. Элюирование длилось около 35 мин, длина пути элюирования составляла 10 см. Для обнаружения разделенных соединений высушенные на воздухе пластинки опрыскивали или 0,2 %-ным раствором перманганата калия в 1 %-ном растворе карбоната натрия, или 0,2 М серной кислотой. После опрыскивания пластинки облучали 15 мин двумя

лампами накаливания мощностью по 250 Вт, при облучении появлялись пятна. Величины  $R_f$  исследованных соединений даны в табл. 31.4.

Таблица 31.4

Величины  $R_f \times 100$  витамина D и родственных соединений, полученные на силикагеле [26]<sup>a, б</sup>

Соединение	10 % ацетона в скеллизолюве В	Хлороформ	5 % ацетона в скеллизолюве В
Витамин D <sub>2</sub>	33	44	15
Витамин D <sub>3</sub>	32	44	15
Эргостерин	27	35	12
7-Дегидрохолестерин	27	35	12
Дигидротахистерин	49	75	24
Холестерин	30	41	—
Ацетат холестерина	98	99	86
Ацетат эргостерина	97	99	79
3,5-Динитробензоат витамина D <sub>2</sub>	96	—	56

<sup>a</sup> С разрешения авторов и American Chemical Society.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

Парекх и Вассерман [27] сочетали колоночную и тонкослойную хроматографию при очистке витамина D<sub>3</sub>, меченного тритием.

Янке и Маас-Гёбельс [28] разработали методику количественного анализа витамина D, основанную на получении минимальных обнаруживаемых пятен веществ. Согласно этой методике, пластинки опрыскивают фосфовольфрамовой кислотой и после этого греют в термостате при 70°C. Поскольку длительность обнаружения хроматограммы составляет около 30 мин, этот метод позволяет быстро оценить содержание витамина D. Кастрен [29] разработал колориметрический метод определения витамина D: пятна витамина элюируют с пластинки и обрабатывают элюат пентахлоридом сурьмы.

Митта и др. [30] разделяли витамин D, люмистерин, фитостерин, холестерин и 7-дегидрохолестерин на тонких слоях закрепленного крахмалом силикагеля, элюируя пробы следующими растворителями: 1) петролейный эфир (60—70°C)—бензол (1:1); 2) хлороформ, 3) бензол—хлороформ (4:1), 4) бензол—хлороформ (1:1), 5) метилэтилкетон—бензол (1:1) и 6) хлороформ—метилэтилкетон—бензол (1:2:1).

Фюрст [31] отделял на слабоактивированном оксиде алюминия витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол) от продуктов его разложения, элюируя смесью петролейный эфир—метанол (250:1). В указанных условиях по слою перемещаются только витамин D<sub>2</sub> и эргостерин. Нерло и Палак [32] отделяли витамин D<sub>3</sub> от продуктов его разложения хроматографированием хлороформом на силикагеле G. Адамский и Савицка [33] определяли витамин D<sub>3</sub> в присутствии витамина А, разделяя экстракт водных растворов на слоях силикагеля G смесью диэтиловый эфир—гексан (1:1). Смеси на масляной основе сначала разбавляли гексаном, а затем наносили на пластинку со слоем оксида алюминия и элюировали смесью эфир—гексан—хлороформ (1:1:1). Количественное определение проводили спектрофотометрически, используя реактив на основе трихлорида сурьмы. Хашми и др. [34] разделяли витамины А, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, Е, К<sub>1</sub> и К<sub>3</sub> методом круговой ТСХ на солях оксида алюминия, элюируя пробы смесью циклогексана с метилизопропилкетон (9:1); при этом они получили следующие величины  $R_f$ : 0,94; 0,46; 0,40; 0,77; 0,85 и 0,60 соответственно. Все перечисленные витамины, кроме D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub>, можно также разделить на силикагеле смесью циклогексана с эфиром (4:1). Витамин D можно отделить от холестерина на силикагеле или оксиде алюминия, используя как элюирующий растворитель дихлорметан [35, 36]. Пинелли и др. [36] предпочитают в качестве элюирующего растворителя смесь этилендихлорид—метилизобутилкетон (9:1). Этот растворитель дает наилучшее разделение в тех случаях, когда необходимо выделить субмикrogramмные количества витамина D из биологических проб. Для хроматографирования биологических экстрактов Пинелли и соавторы употребляли силицизованный силикагель HF<sub>254</sub>. Кемпион и др. [37] применяли метод изотопного разбавления для измерения нанogramмовых количеств витамина D<sub>3</sub>.

Пазалис и Белл [38] хроматографировали 13 сложных эфиров каждого из витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> на силикагеле, элюируя смесями гексана с бензолом (1:1 и 1:2).

### Витамин Е

Благодаря широкому распространению токоферолов в природе и возрастающему значению этих соединений как антиоксидантов необходимы методы их выделения и анализа. Для работ этого типа очень подходит ТСХ. Величины  $R_f$  α-токоферола, полученные с рядом растворителей, даны в табл. 31.2.

Шон опубликовал данные о содержании токоферолов в тунговом масле [39] и выделил из этого масла ранее неизвестный продукт окисления γ-токоферола [40]. На силикагеле G при

элюировании смесью петролейного эфира (40—60°C) с бензолом (1:1) это новое соединение характеризуется  $R_f$  0,50, на том же адсорбенте при элюировании смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир (1:17)  $R_f$  этого соединения равно 0,73. На оксиде алюминия с добавкой 5 % сульфата кальция в качестве связующего при элюировании смесью диэтилового и петролейного эфиров (3:17) получено  $R_f$  0,57. Скиннер и др. [41] также исследовали продукты окисления токоферолов. В данном случае изучались *dl*- $\alpha$ -токоферол и продукты его окисления, причем для разделения этих компонентов на слоях силикагеля применяли смесь циклогексан—хлороформ (2:1). Эти исследователи употребляли для обнаружения зон следующие четыре реактива: 1) 5 %-ный водный раствор феррицианида калия и затем 5 %-ный водный раствор хлорида железа(II); 2) 60 %-ную серную кислоту (после опрыскивания кислотой пластинки нагревают до 150°C); 3) 20 %-ный раствор пентасульфида сурьмы в хлороформе и 4) 10 %-ный раствор молибдата аммония в 10 %-ной серной кислоте (после опрыскивания пластинки нагревают до 150°C). Компоненты исследованных смесей сравнивали со стандартными образцами.

Скиннер и Паркхерст [42] хроматографировали также ряд фенольных соединений, близких по структуре к токоферолам. Дилли [43], а также Дилли и Крейн [44, 45] исследовали содержащиеся в шпинате  $\alpha$ -токоферол и продукт его окисления  $\alpha$ -токоферилхинон, используя для их разделения и идентификации тонкослойную хроматографию на силикагеле G. Эти соединения экстрагировали ацетоном из листьев шпината и затем хроматографировали на тонких слоях, используя в качестве элюирующих растворителей бензол, хлороформ или 1 %-ный раствор диэтилового эфира в хлороформе. Полученные с первыми двумя растворителями величины  $R_f$  приведены в табл. 31.5.

Таблица 31.5

Величины  $R_f \times 100$  токоферолов, полученные на силикагеле G с двумя растворителями [45]

Соединение	Бензол	Хлороформ
$\alpha$ -Токоферол	52	26
$\beta$ -Токоферол	37	20
$\gamma$ -Токоферол	37	18
$\delta$ -Токоферол	24	15

Штурм и др. [46] определяли наличие,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолов в арахисовом масле, элюируя пробы масла хлороформом на силикагеле G. Количественные определения они проводили, элюируя эти соединения после разделения с пластинки и обрабатывая элюаты реактивом Эммери—Энгеля. Эти операции следует выполнять при слабом искусственном свете. Лавледи [47] испытал семь различных элюирующих систем в сочетании с силикагелем G и нашел, что наилучшее разделение  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолов дает смесь циклогексан—*n*-гексан—изопропиловый эфир—аммиак (20:20:10:1). При опрыскивании реактивом, представляющим собой смесь 1,6 г фосфомолибденовой кислоты и 0,092 г 2,7-дихлорфлуоресцеина в 60 мл этанола, к которой добавляют 7,6 мл аммиака и затем разбавляют до 100 мл деионизированной дистиллированной водой, можно выделить и обнаружить витамины при их содержании 0,08 мкг/мкл. Полученные пятна не обесцвечиваются несколько месяцев. Этим методом определяли содержание индивидуальных токоферолов в плазме крови и красных кровяных тельцах [48]. С тем чтобы количественно оценить содержание витаминов, разделенные вещества элюируют с пластинки, получают их триметилсилильные производные и затем анализируют методом газовой хроматографии. Предел обнаружения при использовании водородного пламенного детектора составляет 0,03 мкг. Уиттл и Пеннок [49] разделяли  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолы методом двумерного хроматографирования на силикагеле G, элюируя пробу в одном направлении хлороформом, и в другом смесью петролейный эфир (40—60°C) — диизопропиловый эфир (5:1). Далее зоны элюировали с пластин и обрабатывали реактивом Эммери—Энгеля (T-108). Выход составлял около 92 %. Рао и др. [50] разделяли эти соединения на силикагеле посредством одномерного элюирования смесью петролейный эфир (60—80°C) — диэтиловый эфир—диизопропиловый эфир—ацетон—уксусная кислота (254:3:32:12:3), используя затем ту же методику количественного определения. В этом случае выход разделяемых продуктов составлял 97—98 %. С помощью этой же системы элюентов Стоу [51] разделял  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолы.

Шмандке [52] описал методику разделения на смешанных слоях карбоната цинка и оксида алюминия (1:3) и карбоната цинка и силикагеля (1:1) нескольких токоферолов, а также  $\alpha$ -токоферилхинона, токоферонолактона и 2,5,7,8-тетраметил-2-( $\beta$ -карбокситил)-6-оксихромана. Последний представляет собой продукт разложения  $\alpha$ -токоферола в результате  $\beta$ -окисления. Наилучший элюирующий растворитель при разделении на слое смеси карбоната цинка и оксида алюминия — хлороформ, а при разделении на слое смеси карбоната цинка и силикагеля — смесь бензола с хлороформом (1:1).

Роуган [53] испытал эффективность разделения  $\alpha$ - и  $\beta$ -токоферолов на 15 различных адсорбентах и нашел, что самое лучшее разделение достигается на слое смеси оксида алюминия и бикарбоната цинка (3:1) при элюировании хлороформом и на смеси кизельгура G и бикарбоната цинка (2:1) при элюировании смесью бензол—циклогексан (3:7). Для  $\alpha$ -соединения получены  $R_f$  0,92 и 0,70, а для  $\beta$ -соединения — соответственно 0,54 и 0,33.

Бреккан и др. [54] определяли наличие разных токоферолов в рыбьем жире и в морских животных, применяя не только экстракционную, но и распределительную хроматографию. В первом случае разделение вели на силикагеле, элюируя пробу 10 %-ным раствором диэтилового эфира в гексане, во втором — на пропитанном скваленом цеолите, используя смесь этанол—вода (85:15). Пятна они обнаруживали, опрыскивая пластинки реактивом Эммери—Энгеля [55].

Опубликованы также и другие методики количественного анализа различных токоферолов с использованием ТСХ. Зеер [56, 57] сравнивал площадь пятна на пластинке с количеством вещества. Обнаруживал он пятна, опрыскивая хроматограммы фосфомолибденовой кислотой и затем обрабатывал их параамилаама. Для дифференциации  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолов использовалась предложенная Шульцем и Штраусом [58] модификация реагента Зонненшайна на основе сульфата церия. При обработке этим реагентом  $\beta$ -токоферол дает коричневые пятна, а  $\gamma$ -токоферол — синие. Кастрен [29] определял содержание витамина E в поливитаминных препаратах планиметрическим методом. С этой целью таблетку измельчали, растворяли в воде и опыляли спиртовым раствором гидроксида калия, после чего экстрагировали петролейным эфиром. Далее эфир отгоняли под вакуумом, переводили экстракт в бензольный раствор, который элюировали на пластинке с силикагелем хлороформом или смесью этилацетат—бензол (3:7). Пятна обнаруживали фосфомолибденовой кислотой.

Вуйлемье и др. [59] применили метод сравнения пятен для анализа пищевых продуктов и кормов на содержание  $\alpha$ -токоферола. Хроматографируя пробы на тонких слоях силикагеля, они элюировали их трихлорэтиленом. Ламбертсон и др. [60] применили спектрофотометрический анализ после разделения извлеченных из орехов токоферолов на колонке с оксидом алюминия. Идентичность токофероловых фракций устанавливали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле G, применяя 10 %-ный раствор диэтилового эфира в гексане как элюирующий растворитель. Дилли и Крейн [61] определяли содержание токоферолов и природных хинонов и гидрохинонов спектрофотометрическим методом. Они проводили специальный

анализ на токоферолы; окисляли элюированные с пластинки токоферолы в токоферилхинон хлоридом золота. Непосредственное спектрофотометрическое определение дополнялось измерением уменьшения коэффициента поглощения при 262 нм в результате восстановления хинона в гидрохинон борогидридом калия. Кацуи и др. [62] разделяли токоферолы на слоях силикагеля и оксида алюминия, элюируя их бензолом. Содержание  $\alpha$ -токоферола определяли количественно, элюируя его с пластинки этанолом и обрабатывая элюат реактивом Эммери—Энгеля. Выход продуктов при этом составлял примерно 98 %.

Аратани и др. [63] определяли содержание токоферолов *in situ* денситометрическим методом. Разделение они вели на кварцевых пластинках размером 76×26×0,7 мм, на которые наносили очень тонкие (53 мкм) слои силикагеля с частицами размером менее 325 меш. Максимум поглощения очень ненадолго сдвигался по сравнению с максимумом поглощения в растворе, а стандартное отклонение в определении площади пятен составляло всего 2 %.

#### Витамин К и родственные хиноны

Давидек и Блатна [5] привели величины  $R_f$  витаминов  $K_1$ ,  $K_2$  и  $K_3$ , полученные на незакрепленных слоях оксида алюминия с 13 различными растворителями (табл. 31.6).

Кацуи и др. [4] разделили моноацетаты витаминов  $K_1$ ,  $K_3$  и  $K_4$ , а также диацетат витамина  $K_4$  на силикагеле G и оксиде алюминия G, элюируя пробы бензолом и хлороформом. В качестве обнаруживающих реагентов они применяли 95 %-ную серную кислоту, 60 %-ную хлорную кислоту или 65 %-ную азотную кислоту (табл. 31.6).

Тилеман [64] разделял на силикагеле G витамины  $K_1$ ,  $K_2$  и  $K_3$  смесью бензол—ацетон (9:1). При опрыскивании водным раствором 4-аминофеназона витамин  $K_3$  дает красное пятно. Перишиц-Яньиц и др. [21] разделяли витамины  $K_3$ ,  $K_4$  и  $K_5$  на слоях крахмала или целлюлозы, пропитанных парафиновым маслом. Элюирующим растворителем в этом случае служила смесь вода—диоксан—ацетон—формальдегид (17:4:3:5). С этой системой растворителей можно также проводить разделение на непродитанных слоях талька. Чтобы пятна соединений были видными, в слой вводили флуоресцентный индикатор. Мачинер и Амелотти [65] отделяли фракции витамина K, извлеченного из бычьей печени, на слоях силикагеля, пропитанного раствором нитрата серебра. Элюирующим растворителем служила смесь бензол—гептан (4:1). С этой же целью применяли хроматографирование методом обращенных фаз на пропитанном парафином силикагеле G, используя как растворитель смесь

Таблица 31.6

Величины  $R_f \times 100$  некоторых разновидностей витамина К, полученные в различных хроматографических системах при длине пути элюирования 10 см

Витамины	Силикагель G [4]		Оксид алюминия G [4]		Незакрепленные слои оксида алюминия [5]		
	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	CHCl <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	CHCl <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	CCl <sub>4</sub>
K <sub>1</sub>	67	81	73	80	78	94	74
K <sub>2</sub>		73 <sup>a</sup>			71	88	70
K <sub>3</sub>	29	49	63	75	93	74	49
Моноацетат витамина K <sub>4</sub>	1	3	0	0			
Диацетат витамина K <sub>4</sub>	3	18	22	70			

<sup>a</sup> По данным Вагнера и Денглера [71] и Дилли [43].

ацетон—вода (96:4). Таким образом были выделены менахинон-10, менахинон-11 и менахинон-12. Хаммонд и Уайт [66] применяли пропитанный гексадеканом силикагель G для разделения методом хроматографии с обращенными фазами изопренологов витамина K<sub>2</sub>, элюируя пробу смесью ацетон—вода (95:5). Разделенные соединения можно количественно элюировать с хроматограмм. Если необходимо удалить гексадекан, то это можно осуществить, проводя на силикагеле хроматографирование 5 %-ным раствором хлороформа в гексане или 10 %-ным раствором хлороформа в метаноле.

Мейнс и др. [67] использовали отражательную денситометрию *in situ* для определения содержания витамина K<sub>1</sub> в питательных смесях для грудных детей. Витаминный экстракт отделили от липидов, пропуская через колонку с оксидом алюминия, а затем элюировали на силикагеле сначала тетрахлоридом углерода, а затем в том же направлении бензолом.

Биллетер и Мартиус [68] методом двустадийного хроматографирования на силикагеле G исследовали превращение витаминов K<sub>2(30)}</sub> и K<sub>2(10)}</sub> в витамин K<sub>2(20)}</sub> в организмах птиц и млекопитающих, используя как элюирующие растворители сначала смесь гептан—бензол (1:1), а затем бензол. Для количественного определения они пользовались сцинтилляционным методом.

Вагнер и др. [69—71] разработали методику выделения из сырых липидных экстрактов убихинонов и их идентификации. Согласно этой методике, сначала проводят предварительное разделение убихинонов, хроматографируя исходный продукт на

слоях силикагеля со смесью бензол—хлороформ (1:1). При опрыскивании 0,25 %-ным раствором родамина В в этаноле все убихиноны обнаруживаются в виде одного пятна, которое флуоресцирует фиолетовым цветом и характеризуется  $R_f$  0,86. Убихиноны можно также обнаруживать раствором трихлорида сурьмы в хлороформе. При опрыскивании можно обнаружить до 0,5 мкг соединения. Чтобы разделить индивидуальные убихиноны и определить длину полиизопреновой цепи, это пятно экстрагируют теплым ацетоном порциями по несколько миллилитров. Далее ацетон испаряют под вакуумом, а остаток растворяют в небольшом количестве циклогексана. Разделение достигается методом хроматографии с обращенными фазами на пластинке с силикагелем, пропитанным 5 %-ным раствором парафинового масла в эфире. В качестве элюирующего растворителя следует применять смесь ацетон—вода, насыщенная парафиновым маслом (9:1). При длине пути элюирования 8 см получены следующие величины  $R_f$ :  $U_{30}=0,77$ ,  $U_{35}=0,65$ ,  $U_{40}=0,55$ ,  $U_{45}=0,43$  и  $U_{50}=0,28$ . Если проводится количественное определение, занятую пятном площадь (положение этого пятна определяют сравнением с положением пятна стандарта) элюируют ацетоном до опрыскивания. После испарения ацетона под вакуумом сухой остаток растворяют в циклогексане и измеряют поглощение раствора при 272 нм. Трелфол и Гудвин [72] выделили убихинон-50 и пластихинон-45 из культур меристематической ткани красной розы Пауля.

Экк и Требст [73] исследовали несколько содержащихся в листьях каштана убихинонов и пластохинонов, а также димеров последних. Они проводили разделение на силикагеле, а также на силикагеле, пропитанном парафиновым маслом, и составили таблицу величин  $R_f$  этих соединений.

Хеннингер и Крейн [74], исследуя биологические функции различных природных хинонов, разделяли смеси этих хинонов на тонких слоях силикагеля G (табл. 31.7). Дилли [43, 44] и Хеннингер и др. [75] также пользовались этими методами в различных исследованиях.

Дрюс и др. [76] определяли наличие и распределение убихинонов в ячмене и солоде. Они разделяли убихиноны на силикагеле смесью тетрахлорид углерода—этилацетат (93:7). После разделения индивидуальные соединения восстанавливали боргидридом натрия и полученные хиноны определяли спектрофотометрически с реактивом Эммери—Энгеля.

Икан и др. [77] исследовали содержание убихинонов в тканях моток восточного шершня, проводя предварительное отделение липидов на колонке с флоризилом. Дальнейшую очистку убихиноновой фракции осуществляли на силикагеле G смесью петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота

Таблица 317

Величины  $R_f \times 100$  различных природных хинонов, полученные на силикагеле

Хинон	15 % трихлор-этилацетата в бензоле [74]	1 % эфира в хлороформе [74]	Хлороформ <sup>a</sup> [43]
Пластохинон А	81	74	89
Пластохинон В	88	78	94
Пластохинон С	0	49	58
Пластохинон D	0	40	45
$\alpha$ -Токоферилхинон	21	37	26
$\beta$ -Токоферилхинон	19	33	20
$\gamma$ -Токоферилхинон	16	25	18
$\delta$ -Токоферилхинон			15

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 10 см.

(20:4:1), а окончательное разделение убихинонов проводили методом ТСХ с обращенными фазами на силикагеле G, пропитанном 10 %-ным раствором парафинового масла в гексане. Высушенные пластинки элюировали смесью ацетон—вода (96:4).

## 2. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

### Смеси водорастворимых витаминов

Генсхирт и Мальцахер [78] выделяли растворимые витамины, входящие в состав поливитаминных составов, на слоях силикагеля G. Перед нанесением слоев они примешивали к силикагелю G 2 % флуоресцирующего вещества. Элюирование вели в темноте примерно на 19 см смешанным растворителем, состоящим из уксусной кислоты, ацетона, метанола и бензола (5:5:20:70). Витамин B<sub>1</sub>, витамин C и ниацинамид обнаруживали в виде темных пятен на флуоресцирующем в УФ-свете фоне. Опрыскивая пластинки раствором иодоплатината калия обнаруживали биотин в виде белого пятна на розовом фоне. При обработке этим же реактивом витамин B<sub>1</sub> обнаруживается в виде серого пятна, ниацинамид — светло-желтого, а витамин C — желтого. Если провести опрыскивание 0,1 %-ным раствором дихлорхинонхлоримида в этаноле, то витамин B<sub>6</sub> дает синее пятно, которое обнаруживается после обработки параами

аммиака. Чтобы обнаружить пантотенат кальция, пластинку нагревают полчаса при 160°C, а затем опрыскивают 0,5 %-ным этанольным раствором нингидрина; после вторичного непродолжительного прогревания при 160°C появляется пятно пурпурного цвета.

Ишикава и Кацуи [79] применяли ту же систему при разделении и идентификации на силикагеле G и оксиде алюминия G водорастворимых витаминов и других компонентов поливитаминных составов, поступающих в продажу. Хюттенраух и др. [80] хроматографировали основные компоненты комплекса витамина B на тонких слоях высушенной на воздухе ионообменной смолы (Wofatit CP300). Дитман [81] разделял на слоях целлюлозы витамины B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, фосфат B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> и B<sub>12</sub>, элюируя их смесью пропанол—вода (3:2); никотиновую кислоту и никотинамид он разделял смесью пропанол—этилацетат—аммиак (5:3:2). Тилеман [82, 83] использовал воду как элюирующий растворитель при разделении на слоях силикагеля витаминов B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, никотиновой кислоты, никотинамида и пантотената. Все эти витамины, за исключением витамина C, можно обнаружить с помощью реактива Т-61 (см. т. 1, гл. 5). Витамин C обнаруживали на люминесцирующих слоях при облучении УФ-светом. Петрович и др. [84] разделяли на слоях крахмала витамины B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>2</sub>, C, никотиновую кислоту и пантотенат кальция, элюируя пробы смесью *n*-пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:13). Пантотенат кальция не удается отделить от *n*-аминобензойной кислоты.

Чианг и др. [85] хроматографировали несколько водорастворимых витаминов на слоях смеси полиамида с силикагелем (66:34); элюирующими растворителями служили 10 %-ные растворы хлорида и ацетата натрия. Хашми и др. [86] провели полуквантитативное определение микроколичеств водорастворимых витаминов в смесях методом круговой хроматографии на силикагеле D-O (САМАГ) со смесью вода—96 %-ный этанол—2М соляная кислота (45:48:0,2). Авторы [86] разделили витамины B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, *n*-аминобензойную кислоту и хлорид холина;  $R_f$  этих соединений соответственно равны 0,48; 0,56; 0,61; 0,31; 0,98 и 0,54. Никотиновую кислоту ( $R_f$  0,55) и витамин C ( $R_f$  0,28) разделили смесью бензол—уксусная кислота—ацетон (4:1:1). Бицан-Фиштер и Дражин [87] определяли содержание витаминов B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, никотинамида и *n*-аминобензойной кислоты в таблетках или пилюлях после разделения на силикагеле смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1:1:4:14). Содержание витамина B<sub>2</sub> определяли флуориметрически после элюирования, содержание *n*-аминобензойной кислоты — колориметрически после диазотирования, а содержание остальных компонентов — методом УФ-спектроскопии



после их элюирования с хроматографических пластинок. Точность и воспроизводимость результатов оказались достаточно хорошими. Хашми и др. [87а], применив тонкослойную круговую хроматографию на слоях оксида алюминия со смесью ацетон—уксусная кислота—метанол—бензол (1:1:4:14), получили следующие величины  $R_f$ : В<sub>1</sub> 0,22; никотиновая кислота 0,46; биотин 0,53; хлорид холина 0,28; *n*-аминобензойная кислота 0,58; В<sub>12</sub> 0,28 и В<sub>6</sub> 0,30. Обратите внимание, что величины  $R_f$  витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> совпадают с полученными Ишикава и Кацуи [79] для соответственно В<sub>2</sub> и В<sub>1</sub> на тех же адсорбентах и с теми же элюирующими растворителями (см. табл. 31.8).

Таблица 31.8

Величины  $R_f \times 100$  некоторых водорастворимых витаминов

Витамины	CH <sub>3</sub> COOH—CH <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub> OH—C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (5:5:20:70)			10 %-ный C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, WOFATIT CP300 [80]
	Силикагель G		Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> G [79]	
	[78]	[79]		
В <sub>1</sub> ·HCl или HNO <sub>3</sub>	0	0	54	0
В <sub>2</sub>	35	29	24	42
В <sub>6</sub> ·HCl	15	12	26	35
Биотин	80	55	54	
Пантотенат кальция	57	40	0	
Никотинамид	65	44	62	70
Аскорбиновая кислота	30	25	0	
Фолиевая кислота		7	0	
В <sub>12</sub>		0	23	100
Никотиновая кислота				100
Карнитин·HCl		3	20	
Инозит		2	0	

Нуттол и Буш [88] разделяли водорастворимые витамины, входящие в поливитаминные составы, нанося аликвотные части водного экстракта такого состава на два слоя силикагеля HF<sub>254+366</sub> и один слой целлюлозы. Один из слоев силикагеля элюировали смесью 2-пропанол—*n*-бутанол—вода (1:3:1), а затем обрабатывали зону с  $R_f < 0,15$  реактивом Т-107, чтобы обнаружить тартрат холина в виде темно-красного пятна

с  $R_f 0,04$ . Остальную часть хроматограммы опрыскивали нингидрином, и после 5-минутного нагревания при 80°C появилось темно-красное пятно метионина, которому соответствует  $R_f 0,26$ ; дальнейшее нагревание при 140°C приводило к появлению пятна пантенола с  $R_f 0,56$ . Второй слой силикагеля элюировали смесью ацетон—уксусная кислота—бензол—метанол (1:1:14:4). При облучении УФ-светом становились видимыми пятна рибофлавина ( $R_f 0,32$ ) и никотинамида ( $R_f 0,64$ ). Область с  $R_f > 0,50$  обрабатывали реактивом Т-61, при этом биотин обнаруживался в виде темно-синего пятна с  $R_f 0,78$ . Оставшуюся часть хроматограммы обрабатывали реактивом Т-84; пиридоксин под действием этого реактива дает синее пятно с  $R_f 0,13$ . (При обработке пластинки последними двумя реактивами оставшуюся часть хроматограммы закрывали простой стеклянной пластинкой, чтобы предохранить эту часть от воздействия аммиака и хлора.) Слой целлюлозы элюировали смесью 10 %-ный аммиак—метанол (3:7). Витамины В<sub>1</sub> ( $R_f 0,45$ ) обнаруживали сначала при облучении УФ-светом; далее после облучения обрабатывали в течение 30 мин реактивом Т-174, чтобы обнаружить фолиевую кислоту, которой соответствует  $R_f 0,30$ . В работе [88] указан порог чувствительности определения ряда соединений: тартрат холина 3 мкг; метионин 0,3 мкг; пантенол 1 мкг; биотин 0,3 мкг; пиридоксин 0,1 мкг; рибофлавин 0,2 мкг; никотинамид 3 мкг и фолиевая кислота 0,2 мкг. Сравнивая полученные пятна с пятнами известных количеств витаминов, можно оценить полуколичественное содержание витаминов в пробе.

Величины  $R_f$  некоторых водорастворимых витаминов приведены в табл. 31.8.

### Витамин В<sub>1</sub>

Давид и Гиршфельд [89] анализировали тиамин и его фосфаты на тонких слоях целлюлозы и ее производных. Полученные результаты показаны в табл. 31.9. Для тех же соединений на слоях силикагеля получены следующие величины  $R_f$ : 0,92; 0,50; 0,17 и 0,08 соответственно; элюирующим раствором в данном случае служила смесь пиридин—вода—аммиак—метанол—уксусная кислота (6:6:5:1:1) [90]. Чуанг и др. [91] хроматографировали на полиамиде Applan CM 1011 (Тоуо Рауон) тиамин и его производные, применяя как растворители ацетон, смесь ацетон—диэтиловый эфир—уксусная кислота (20:20:1), метилэтилкетон и смесь хлороформ—этилацетат—уксусная кислота (20:20:1). Дживеди и др. [92, 93] исследовали с помощью ТСХ продукты термического разложения тиамин. В качестве адсорбента эти авторы выбрали силикагель,

Таблица 319

Величины  $R_f \times 100$  тиамина и его фосфатов, полученные на слоях целлюлозы и ее производных [189]<sup>а, б</sup>

Адсорбент	Растворитель	Разделяемые вещества			
		Тиамин	МРТ <sup>в</sup>	ДРТ <sup>г</sup>	ТРТ <sup>д</sup>
Целлюлоза MN300G	<i>n</i> -Пропанол — ацетатный буферный раствор (рН 5) — вода (7:2:1)	65	26	14	5
	<i>n</i> -Пропанол — фосфатный буферный раствор (рН 4,9) — вода (3:1:1)	80	47	30	1
Монофосфат целлюлозы MN300P	0,03 н. соляная кислота	10	30	73	80
	Буферный раствор гликокола, соляной кислоты и хлорида натрия (рН 1,4)	23	48	75	
	Буферный раствор гликокола и соляной кислоты (рН 2,05)	15	40	75	
	Ацетатный буферный раствор (рН 3,58)	5	15	60	
Карбоксиметил-целлюлоза MN300CM MN300CM	0,03 н. соляная кислота	30			
	Ацетатный буферный раствор (рН 3,58)	30			

<sup>а</sup> С разрешения авторов и Société Chimique de France.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

<sup>в</sup> МРТ — монофосфат тиамина.

<sup>г</sup> ДРТ — дифосфат тиамина (кокарбоксилаза).

<sup>д</sup> ТРТ — трифосфат тиамина.

а в качестве элюирующего растворителя — смесь ацетонитрил—вода (4:1), рН которой доводили до 2,54, добавляя муравьиную кислоту. Ариаэй-Неджд и др. [94] исследовали продукты метаболизма тиамина в организме человека. Хроматографирование они вели на слоях целлюлозы с 8 различными элюирующими системами.

### Витамин В<sub>6</sub>

Нюрнберг [95] отделил гидрохлорид пиридоксина от гидрохлоридов пиридоксала и пиридоксамина, используя многостадийное хроматографирование на пластинках с силикагелем. Первое элюирование он проводил ацетоном на расстояние 14 см. Второй раз он элюировал пробу также на 14 см, но уже смесью ацетон—диоксан—25 % -ный гидроксид аммония

(4,5:4,5:1). В обоих случаях элюирование вели в камере с насыщенной атмосферой. Однако при экстракции этих соединений, проведенной, как обычно, метанолом, пиридоксаль частично превращается в соответствующий ацеталь и поэтому образует при хроматографировании два или три пятна. Чтобы избежать образования лишних пятен, образец кипятят с метанолом в колбе с обратным холодильником в темноте в течение часа; при этом пиридоксаль полностью переходит в ацеталь. Последний можно отделить от пиридоксина и пиридоксамина с помощью той же растворяющей системы. В указанных условиях получены следующие величины  $R_f$ : пиридоксин 0,2; метилацеталь пиридоксала 0,25 и пиридоксамина 0,55. Обнаруживающим реактивом служил 0,4 %-ный раствор 2,6-дибромхинон-хлоримида в метаноле.

Дейл и Росмус [96] изучали серусодержащие производные пиридоксина, содержащиеся в стерилизованном сгущенном молоке. Эти авторы смогли отделить друг от друга бис-4-пиридоксидисульфид, 4-пиридокстиол и пиридоксол, хроматографируя их производные с азокрасителями. На незакрепленных слоях оксида алюминия, элюируя пробы смесью этанол—амиловый спирт—вода (1:1:1), они получили  $R_f$  0,80; 0,52 и 0,85 соответственно.

Дементьева и др. [97] разделили на микропластинках с силикагелем нефосфорилированные соединения группы витамина В<sub>6</sub>, применив смесь этилацетат—ацетон—25 %-ный раствор аммиака (40:20:3). Для разделения 5'-фосфатов они использовали смесь *n*-бутанол—этанол—5 %-ный раствор аммиака—уксусная кислота (10:10:10:1). Аренс и Коритник [98] хроматографировали на силикагеле и на целлюлозе 9 соединений группы витамина В<sub>6</sub> с 7 элюирующими системами. На силикагеле HF<sub>254</sub> со смесями аммиак—вода (1:139) и хлороформ—метанол (3:1) получены следующие величины  $R_f \times 100$ : пиридоксол 62, 47; пиридоксаль 68, 56; пиридоксамин 12, 5; этилацеталь пиридоксала 54, 84; 4-пиридоксовая кислота 91, 49; лактон 4-пиридоксовой кислоты 91, 18; пиридоксолфосфат 95, 0; пиридоксальфосфат 95, 0; пиридоксаминфосфат 86, 0. Указанные три фосфата можно разделить смесью метилэтилкетон—этанол—аммиак—вода (15:5:5:5);  $R_f \times 100$  этих трех соединений равны соответственно 30; 54 и 41. Из числа использованных обнаруживающих реактивов диазотированный *n*-нитроанилин (Т-180) давал несколько более устойчивую окраску (оранжево-красную), чем реагент Джинба (Т-264), хотя чувствительность обнаружения была одинаковой — около 0,1 мкг.

Для разделения соединений группы витамина В<sub>6</sub> можно также применять электрофорез. Пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин и соответствующие фосфаты разделяли на слоях

силикагеля, пропитанных ацетатными буферными растворами (рН 3,95 или 4,53), при напряжении 500 В, причем сила тока возрастала для обоих буферных растворов соответственно от 19 до 30 мА и от 28 до 43 мА [98]. Коломбини и Мак-Кой [99] разделяли витамины, полученные из экстрактов тканей, также методом тонкослойного электрофореза на пропитанных 0,5 М буферным раствором ацетата натрия слоях целлюлозы. Разделение проводили на пластинке размером 46×20 см в течение 3 ч при напряжении 750 В или в течение 4 ч при напряжении 600 В. Меченые соединения определяли с помощью сцинтилляционного счетчика, а немеченые можно определять количественно с чувствительностью 0,1 мкг спектрофлуориметрическим методом после элюирования с пластинки.

### Витамин В<sub>12</sub>

Цима и Мантован [100] разделяли цианокобаламин и гидроксокобаламин на обработанных 0,066 М буферным раствором монофосфата калия пластинках с силикагелем, элюируя пробу смесью бутанол—уксусная кислота—вода—метанол (20:10:20:5), или на обработанных водой пластинках с силикагелем, элюируя буферным раствором. Разделенные соединения элюировали с пластинок и определяли количественно спектрофотометрическим методом. Ковелло и Скеттино [101] анализировали эти соединения в виде дицианокобаламинов; с этой целью их предварительно обрабатывали 0,1 %-ным раствором цианида калия. Последующее хроматографирование проводили на силикагеле G или на оксиде алюминия G, используя в качестве элюирующего растворителя 95 %-ный метанол. Погрешность количественного анализа 11 различных лекарственных препаратов составляла от 6 % при содержании 0,05 мкг/мл до 0,4 % при содержании 500 мкг/мл. Оно и Кавасаки [102] хроматографировали гидроксокобаламин и цианокобаламин на силикагеле G со смесью ледяная уксусная кислота—вода—метанол—хлороформ—бутанол (9:11:5:10:25) и получили  $R_f$  0,05 и 0,23 соответственно. Для обнаружения пятен применяли биоавтографический метод, используя в качестве среды раствор витамина В<sub>12</sub> в агаре, а в качестве реагирующих организмов — *Lactobacillus leichmannii* ATCC 1830. Минимальные обнаруживаемые количества составляли 0,005 нг гидроксокобаламина и 0,025 нг цианокобаламина.

Попова и др. [103] разделяли цианокобаламин и гидроксокобаламин на нейтральном оксиде алюминия (активность по Брокману II), элюируя пробу смесью изобутанол—изопропанол—вода (1,5:1:1,25), рН которой доводили до 8,5, добавляя гидроксид аммония. Согласно данным авторов работы [103],

$R_f$  этих соединений равны 0,30 и 0,46. Цианокобаламин, псевдовитамин В<sub>12</sub> и витамины В, В<sub>12</sub>, V(nB) и А анализировали на основном оксиде алюминия (активность по Брокману II); элюирующим растворителем при этом служила смесь изобутанол—изопропанол—вода (1:1:1). Величины  $R_f$  в указанных условиях составляют соответственно 0,62; 0,25; 0,74; 0,46; 0,12 и 0,37 [104]. Пробы наносили на пластинку в виде раствора в 5 %-ном цианиде калия для того, чтобы сначала образовывались дицианокомплексы, которые в процессе хроматографирования разлагаются с образованием моноцианокомплексов. Сасаки [105] применял слой целлюлозы MN300CM для разделения цианокобаламина, гидроксокобаламина и аденилкобаламина, бензимидазолкобаламина и диметилбензимидазолкобаламина коферментов. В этом случае, чтобы разделение было хорошим, в растворе пробы не должно быть и следов неорганических ионов. Автор работы [105] элюировал пробу нижней фазой смеси втор-бутанол—0,1 М ацетатный буферный раствор (рН 3,5)—метанол (4:12:1).

Соединения группы витамина В<sub>12</sub> окрашены в красный цвет, поэтому их можно обнаружить визуально при содержании до 0,3 мкг. Ковелло и Скеттино [106] определяли содержание цианокобаламина и гидроксокобаламина in situ методом денситометрии.

### Витамин В<sub>2</sub>

Смит и Метцлер [107] изучали фотохимическое разложение рибофлавина на пластинках с силикагелем G с двумя следующими системами растворителей: бутанол—этанол—вода (7:2:1) и вода, насыщенная изоамиловым спиртом. Разделенные соединения обнаруживали благодаря их флуоресценции синего или желто-зеленого цвета в УФ-свете. Тредуэлл и Метцлер [108] разработали методику обнаружения флавинов в тканях растений в количествах до 0,2 нг. Пробу ткани экстрагируют раствором сульфата аммония, отделяют осадок центрифугированием и вводят его в колонку с резорцинформальдегидной смолой, чтобы отделить флавины от солей, остаточных белков и некоторых пигментов промывкой водой; при введении экстракта в колонку и последующей промывке флавиновые нуклеотиды проходят через смолу [109]. Элюированные смесью ацетона с водой флавины вводят затем в водном растворе в сухую колонку с тальком с тем, чтобы извлечь большую часть нефлавиновых пигментов смесью ацетон—вода (1:9). Из этой колонки флавины элюируют смесью ацетон—вода (1:1) и наносят на слой силикагеля. Авторы работы [108] использовали для разделения флавинов на силикагеле 10 растворителей,

в том числе нижнюю фазу смеси бензиловый спирт—уксусная кислота—вода (3:1:3) ( $R_f$ : люмихром 0,91, рибофлавин 0,46, рибофлавинилглюкозид 0,24) и смесь уксусная кислота—2-бутанон—метанол—бензол (5:5:20:70). Пятна соединений детектировали при облучении УФ-светом; при очень маленьком содержании люмихрома в пробе необходимо предварительно дважды элюировать пластинку, чтобы удалить флуоресцирующие примеси из силикагеля. Хеурт и др. [109] определяли в моче рибофлавин и продукты его метаболизма на слое силикагеля, элюируя пробу смесью толуол—метанол—уксусная кислота (10:9:1). Мешающие разделению компоненты удаляли предварительной очисткой—осаждением и хроматографированием на колонке. Содержание рибофлавина ( $R_f$  0,44) определяли методом флуоресцентной денситометрии. Исмаиль и Ясса [110] выделяли рибофлавин из лекарственных составов на силикагеле смеси хлороформ—98 %-ный этанол—вода (50:25:1), затем элюировали его с пластинок ацетатным буферным раствором с pH 4 и измеряли поглощение элюата при 444 нм.

### Никотиновая кислота и никотинамид

Нюрнберг [111] разделял никотиновую кислоту и никотинамид на воздушно-сухих слоях силикагеля G, элюируя пробу свежеприготовленной смесью *n*-пропанол—10 %-ный раствор аммиака (95:5) в камере с ненасыщенной атмосферой. При длине пути элюирования 8 см он получил  $R_f$  соответственно 0,35 и 0,6—0,7. Чтобы обнаружить пятна этих соединений, Нюрнберг сначала опрыскивал пластинку 5 %-ным раствором *n*-аминобезойной кислоты в метаноле, а затем выдерживал в парах хлорциана. (**Осторожно!** Яд!) Чтобы получить хлорциан, смешивали 20 мл 28 %-ной суспензии хлорамина, 20 мл 1 н. соляной кислоты и 10 мл 10 %-ного раствора цианида калия. Никотиновая кислота дает красное пятно, а никотинамид—оранжево-красное. Этот метод пригоден для полуколичественного определения: полученные пятна сравнивают с рядом пятен растворов известной концентрации; он весьма специфичен и позволяет определять содержание этих соединений в поливитаминных смесях без предварительного разделения. Чувствительность обнаружения составляет 0,1 мкг. В такой же хроматографической системе бензиловый эфир никотиновой кислоты характеризуется  $R_f$  0,69 [112]. Васхюттль [113] использовал для количественной оценки метод, основанный на определении площади пятен, а Исмаиль и Ясса [114] элюировали разделенные соединения с пластинки и измеряли поглощение элюата при 261 нм. Бруник и Вессельс [115] определяли содержание ни-

котиновой кислоты в мясе методом флуориметрии *in situ*. Молодецка и Сековска [116] хроматографировали на силикагеле с 10 элюирующими системами никотиновую и изоникотиновую кислоты, их амиды и нитрилы. В воде и в смеси этанол—хлороформ—25 %-ный раствор аммиака—вода (35:20:10:1) получены соответственно следующие величины  $R_f$ : никотиновая кислота 0,64 и 0,53; амид никотиновой кислоты 0,41 и 0,71; нитрил никотиновой кислоты 0,45 и 0,84; изоникотиновая кислота 0,76 и 0,53; амид изоникотиновой кислоты 0,49 и 0,71; нитрил изоникотиновой кислоты 0,47 и 0,84. Величины  $R_f$ , полученные с другими растворителями, даны в этой работе в форме таблицы.

### Витамин С

Для определения содержания аскорбиновой кислоты в картофеле Гассельквист и Яарма [117] хроматографировали экстракт картофеля на слоях силикагеля G, элюируя пробу раствором 2 г щавелевой кислоты в 20 мл метанола, смешанным с 60 мл хлороформа, содержащим следовые количества цианида калия. Этим растворителем пробу элюировали на 10 см за 35 мин, после чего в течение 2 мин сушили пластинку при комнатной температуре. Витамин С обнаруживали в виде синего пятна после опрыскивания раствором 5 г фосфомолибденовой кислоты в 100 мл 96 %-ного этанола. Минимальное обнаруживаемое количество служило мерой порога чувствительности определения аскорбиновой кислоты в картофеле. Этот метод, по существу полуколичественный, дает более надежные результаты, чем спектрофотометрическое определение, потому что при хроматографировании удаляются мешающие определению восстанавливающие соединения. Штроэккер и Пис [118] определяли витамин С в пищевых продуктах, содержащих растворимые углеводы, в виде 2,4-динитрофенилгидразонов. Они проводили разделение на воздушно-сухих пластинках со слоем силикагеля G, элюирующим растворителем служила смесь хлороформ—этилацетат (1:1). При длине пути элюирования 15 см  $R_f$  этого производного витамина С составляет 0,25. При количественном определении пятно элюировали 85 %-ной серной кислотой и проводили фотометрическое измерение. Результаты определений, проведенных этим и несколькими другими методами, сравниваются в табл. 31.10.

Гувен и Алпар [119] разделяли на силикагеле G аскорбиновую ( $R_f$  0,8) и дегидроаскорбиновую ( $R_f$  0,5) кислоты, элюируя их смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (3:3:10:24). Обнаруживали кислоты, опрыскивая пластинку 1 %-ным раствором фенилендиамина в уксусной кислоте

Таблица 31 10

Содержание витамина С в некоторых пищевых продуктах, определенное модифицированным динитрофенилгидразиновым методом (ТСХ) [118]<sup>a</sup>

Материал	Способ определения		
	ТСХ	титрование дихлорфенолом и индофенолом	полярография
Модельный раствор А (500 мг аскорбиновой кислоты и 50 г глюкозы на литр)	497 мг/л	498 мг/л	
Модельный раствор В (500 мг аскорбиновой кислоты и 50 г сахарозы на литр)	492 мг/л	497 мг/л	
Апельсиновая фруктовая вода А	325 и 328 мг/л	340 мг/л	335 мг/л
Апельсиновая фруктовая вода В	442 мг/л	455 мг/л	460 мг/л
Апельсиновая фруктовая вода С	463 мг/л	404 мг/л	475 мг/л
Шоколад А (вита-минизированный)	31,9 мг/15 г	35 мг/15 г	
Шоколад В (вита-минизированный)	56,3 мг/100 г	60,6 мг/100 г	
Сок черной смородины	550 мг/л	Не титровали	
Диетическая жидкость на основе солода, с добавкой витаминов	53,5 мг/5 мл	54,2 мг/5 мл, титровали 0,1 н раствором хлорамина	49,5 мг/5 мл определено фотометрически

<sup>a</sup> С разрешения авторов и J. F. Bergmann.

и нагревая затем ее за 2 мин до 100°C. Хюттенрах и Кейнер [120] выбрали в качестве адсорбента для разделения аскорбиновой ( $R_f$  0,10) и дегидроаскорбиновой ( $R_f$  0,72) кислот полиамид с добавкой 2 % флуоресцентного индикатора, а в качестве элюирующего растворителя — смесь этанол—вода (13 : 7).

### Фолиевая кислота

Для фолиевой кислоты получены  $R_f$  0,07 на силикагеле G и  $R_f$  0,0 на оксиде алюминия; в обоих случаях элюирование велось смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1 : 1 : 4 : 14) [79, 87a]. Со смесью уксусная кислота—бутанол—вода получена на оксиде алюминия  $R_f$  0,23 [79]. Йер и Апте [121] применяли силикагель G для количественного определения фолиевой кислоты в витаминных препаратах, выделяя это соединение смесью бутанол—уксусная кислота—этанол—вода (250 : 1 : 100 : 125), а затем элюируя его с пластинки 3 %-ным раствором динатрийфосфата. К полученному элюату добавляли хлорид натрия, переводили фолиевую кислоту с выходом 98 % в изобутанольный раствор и измеряли спектральное поглощение этого раствора при 550 нм. Спинелли и Циуффи [122] выделяли эту кислоту смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (6 : 1 : 1) на силикагеле HF после предварительного разделения в колонке, заполненной смесью оксида алюминия и талька. Чтобы оценить количественно содержание фолиевой кислоты, ее элюировали с пластинки 30 %-ным раствором аммиака и затем после добавления реагента Зонненшайна проводили спектрофотометрическое определение. Попова и Ковачева [123, 124] окисляли фолиевую кислоту перманганатом калия в кислой среде, получая 2-амино-4-окси-6-птеридинкарбонную кислоту, которую выделяли на незакрепленном слое нейтрального оксида алюминия, элюируя пробы 0,1 М раствором цитрата натрия. Затем экстрагировали эту кислоту 0,1 М раствором моносодийфосфата и определяли ее содержание флуориметрически с относительной погрешностью 0,53 %.

Гувен и Пекин [125] хроматографировали фолиевую кислоту на силикагеле G смесью *n*-пропанол—10 %-ный раствор аммиака—глицерин (4 : 1 : 1) и получили  $R_f$ , равное 0,41. Крейциг [126] анализировал фолиевую кислоту на двойном слое, состоящем из узкой полоски целлюлозы MN300, смешанной со смолой дауэкс 50-X8 в соотношении 4 : 1, и слоя целлюлозы. Неочищенный экстракт грибкового мицеллия наносили на ионообменный слой и обессоливали, элюируя смесью аммиак—метанол—вода (3 : 10 : 7) вплоть до слоя целлюлозы. После этого удаляли ионообменный слой и заканчивали элюирование фолиевых кислот 5 %-ным раствором лимонной кислоты, рН которого

доводили до 9, добавляя аммиак. Копенхейвер и О'Брайен [127] разделяли смеси птероилглутаматов и родственных соединений на слое смеси целлюлозы и смолы AG50-W-X4 (H+) (фракции 200—400 меш), взятых в соотношении 17,5:2,5. Анализируемую смесь элюировали 15 %-ным буферным раствором динатрийфосфата (рН 8,5), к которому добавляли антиоксидант — 0,1 М меркаптоэтанол. Браун и др. [128] определяли содержащиеся в крови фолаты методом распределительной хроматографии на слоях целлюлозы MN300, элюируя пробу 3 %-ным раствором хлорида аммония (масса/объем) с добавкой 0,5 %- меркаптоэтанола. В обеих работах [127, 128] даны величины  $R_f$  ряда природных фолиатов, а также некоторых родственных соединений. Чувствительность определения методом гашения флуоресценции менее 3,0 мкг, и флуоресцирующие соединения можно обнаружить в субмикrogramмовых количествах.

#### Пантотеновая кислота

Для пантотеновой кислоты получены на силикагеле G следующие величины  $R_f$ : 0,57 при элюировании смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1:1:4:14) [79], 0,31 при элюировании смесью бутанол—уксусная кислота—вода (20:4:3) [125] и 0,41 при элюировании смесью пропанол—10 %-ный аммиак—глицерин (4:1:1) [125]. Зиванов-Стакич и сотр. [129] в числе других водорастворимых витаминов хроматографировали на силикагеле пантотенат кальция и пантотенол, элюируя витамины смесями *трет*-бутанол—диоксан—диизопропилловый эфир—вода (1:1:2,5:0,5), хлороформ—бутанол (3:2), а также хлороформ—диоксан—диэтиловый эфир (2:3:1). Пантотенол обнаруживали содержащим иод раствором хлорида железа(II), а пантотенат кальция — реактивом Эрлиха (Т-90). С 10 %-ным раствором сульфата меди в 2 %-ном аммиаке пантотеновая кислота дает синюю окраску [125]. Франк и др. [130] хроматографировали пантотенат кальция на целлюлозе MN300 смесью бутанол—этанол—вода (4:3:3) и получили одно пятно с  $R_f$  0,65 и второе пятно с  $R_f$  0,40; появление второго пятна обусловлено образованием  $\beta$ -аланина — продукта гидролиза пантотеновой кислоты. Пятна становились видимыми после обработки нингидрином с последующим 30-минутным нагреванием при 105°C.

#### Прочие водорастворимые витамины

В работе [79] приведены  $R_f$  биотины, полученные на оксиде алюминия G и силикагеле G (соответственно 0,54 и 0,50) со смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1:1:4:14).

*n*-Аминобензойная кислота при хроматографировании на силикагеле G со смесью уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1:1:4:14) характеризуется  $R_f$  0,64 [79]; с помощью этого растворителя Бицан-Фиштер и Дражин [87] отделяли *n*-аминобензойную кислоту от других витаминов и после экстрагирования и диазотирования определяли ее количественно колориметрически. На силикагеле D-O (САМАG) со смесью вода—96 %-ный этанол—2 М соляная кислота (45:48:0,2) эта кислота характеризуется  $R_f$  0,98 [86]. Шерма и Дорфлингер [131] разработали методику учебного эксперимента — количественного определения этого витамина в моче хроматографированием на силикагеле смесью бензол—уксусная кислота (5:1) с последующей прямой денситометрией после диазотирования непосредственно на слое.

Хашми и др. [87а] получили  $R_f$  хлорида холина на оксиде алюминия G, используя как элюирующий растворитель смесь уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (1:1:4:14), и на силикагеле со смесью вода—96 %-ный этанол—2 М соляная кислота (45:48:0,2) [86]. В первом случае  $R_f$  равно 0,28, во втором 0,54. В работе [132] описано разделение бетаина ( $R_f$  0,75), холина ( $R_f$  0,77) и мускарина ( $R_f$  0,87) на оксиде алюминия G со смесью метанол—тетрахлорид углерода—уксусная кислота (28:12:1). Скидмор и Энтенмен [133] получили  $R_f$  холина (0,09) на силикагеле G со смесью метанол—вода—7 н. раствор аммиака (6:3:1). Радецка и др. [134] анализировали лекарственные препараты на оксиде алюминия. Хлорид холина выделяли смесью хлороформ—метанол—вода (75:23:3), а другие соли холина — смесью хлороформ—метанол—1 н. соляная кислота (40:60:3). Обнаруживали эти соединения, опрыскивая пластинки смесью 5 %-ного водного раствора хлорида кобальта с этанолом (1:1) и затем смесью 1 %-ного водного раствора ферроцианида калия с этанолом (1:2). Для количественного определения применяли денситометрию *in situ*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lagoni H., Wortmann A., Intern. Dairy Congr., 14th, Rome, 1956.
2. Lagoni H., Wortmann A., Milchwissenschaft, 11, 206 (1956).
3. Planta C. V., Schwieter U., Chopard-dit-Jean L., Rueegg R., Kofler M., Isler O., Helv. Chim. Acta, 45, 548 (1962).
4. Katsui G., Ishikawa S., Shimizu M., Nishimoto Y., Vitamin, 28, 41 (1963); Chem. Abstr., 60, 9577 (1964).
5. Davidek J., Blatná J., J. Chromatogr., 7, 204 (1962).
6. Varma T. N. R., Panalaks T., Murray T. K., Anal. Chem., 36, 1864 (1964).
7. John K. V., Lakshmanan M. R., Jungalwala F. B., Cama H. R. J. Chromatogr., 18, 53 (1965).
8. Кузнецова Л. М., Ковалева В. М., Укр. биохим. журн., 36, 302 (1964).

9. Еремина Г. В., Лабор. дело, 1968, 81.
10. Adamski R., Dobrucki R., Acta Pol. Pharm., 25, 307 (1968).
11. Ludwig E., Freimuth U., Nahrung, 8, 563 (1964).
12. Koleva M., Dzhoneidi M., Budevski O., Pharmazie, 30, 168 (1975).
13. Baczyk S., Baranowska K., Jakubowska W., Sobisz I., Z. Anal. Chem., 255, 132 (1971).
14. Johnson G. W., Vickers C., Analyst (London), 98, 257 (1973).
15. Hanewald K. H., Mulder F. J., Keuning K. J., J. Pharm. Sci., 57, 1308 (1968).
16. Кузнецова Л. М., Ковалева В. М., Укр. биохим. журн., 36, 302 (1964).
17. Zile M., DeLuca H. F., Anal. Biochem., 25, 307 (1968).
18. Adamski R., Dobrucki R., Marchlewska B., Farm. Pol., 30, 1023 (1974).
19. Drujan B. D., Castillon R., Guerrero E., Anal. Biochem., 23, 44 (1968).
20. Keefer L. K., Johnson D. E., J. Chromatogr., 69, 215 (1972).
21. Perišić-Janjić N., Petrović S., Hadzić P., Chromatogr., 9, 130 (1976).
22. Ropte D., Gu J. U., Pharmazie, 27, 544 (1972).
23. Richter J., Ropte D., Pharmazie, 24, 601 (1969).
24. Blatná J., Devidek J., Experientia, 17, 474 (1961).
25. Kakač B., Saršúnová M., Tran Thi Hoang Ba, Vachek J., Pharmazie, 22, 202 (1967).
26. Norman A. W., DeLuca H. F., Anal. Chem., 35, 1247 (1963).
27. Parekh C. K., Wasserman R. H., J. Chromatogr., 17, 261 (1965).
28. Janecke H., Maass-Goebels I., Z. Anal. Chem., 178, 161 (1960).
29. Castren E., Farm. Aikak., 71, 351 (1962).
30. Miita A. E. A., Troparevsky A., de Troparevsky M. L. P. Agr. Rep. Com. Nacl. Energia At., Informe, 123, 7 pp. (1964); Chem. Abstr., 62, 2667 (1965).
31. Fuerst W., Arch. Pharm. (Weinheim), 300, 359 (1967).
32. Nerlo H., Palak W., Acta Pol. Pharm., 24, 399 (1967).
33. Adamski R., Sawicka J., Farm. Pol., 26, 131 (1970).
34. Hashmi M. H., Chughtai F. R., Chughtai M. I. D., Microchim. Acta, 1969, 53.
35. Fisher A. L., Parfitt A. M., Lloyd H. M., J. Chromatogr., 65, 571 (1972).
36. Pinelli A., Witzke F., Nair P. P., J. Chromatogr., 42, 271 (1969).
37. Campion T. H., Dilley S., Anal. Lett., 6, 139 (1973).
38. Pasalis J., Bell N. H., J. Chromatogr., 20, 407 (1956).
39. Shone G., Sci. J., Food Agric., 13, 315 (1962).
40. Shone G., Chem. Ind. (London), 1963, 335.
41. Skinner W. A., Parkhurst R. M., Alaupovic P., J. Chromatogr., 13, 240 (1964).
42. Skinner W. A., Parkhurst R. M., J. Chromatogr., 13, 69 (1964).
43. Dilley R. A., Anal. Biochem., 7, 240 (1964).
44. Dilley R. A., Crane F. L., Biochem. Biophys. Acta, 75, 142 (1963).
45. Dilley R. A., Crane F. L., Plant Physiol., 38, 452 (1963).
46. Sturm P. A., Parkhurst P. M., Skinner W. A., Anal. Chem., 38, 1244 (1966).
47. Lovelady H. G., J. Chromatogr., 78, 449 (1973).
48. Lovelady H. G., J. Chromatogr., 85, 81 (1973).
49. Whittle K. J., Pennock J. F., Analyst (London), 92, 423 (1967).
50. Govind Rao M. K., Venkob Rao S., Achaya K. T., J. Sci. Food Agric., 16, 121 (1965).
51. Stowe H. D., Arch. Biochem. Biophys., 103, 42 (1963).
52. Schmandke H., J. Chromatogr., 14, 123 (1964).
53. Roughan P. G., J. Chromatogr., 29, 293 (1967).
54. Braekkan O. R., Lambertsen G., Muklestad H., Fisk. Skr. Ser. Teknol. Unders., 4, 3 (1963).
55. Emmerie A., Engel C., Rec. Trav. Chim., 57, 1371 (1939).
56. Seher A., Microchim. Acta, 1961, 308.
57. Seher A., Wahrung, 4, 466 (1960).
58. Schultz O. E., Strauss D., Arzneim.-Forsch., 5, 342 (1955).
59. Vuilleumier J. P., Brubacher G., Kalivoda M., Helv. Chim. Acta, 46, 2983 (1963).
60. Lambertsen G., Myklestad H., Braekkan O. R., J. Sci. Food Agric., 13, 617 (1962).
61. Dilley R. A., Crane F. L., Anal. Biochem., 5, 531 (1963).
62. Katsumi G., Ichimura Y., Nishimoto Y., Yakuzai-gaku, 23, 299 (1963); Chem. Abstr., 61, 2168 (1964).
63. Aratani T., Mita K., Mizui F., J. Chromatogr., 79, 179 (1973).
64. Thielemann H., Microchim. Acta, 1972, 227.
65. Matschiner J. T., Amelotti J. M., J. Lipid Res., 9, 176 (1968).
66. Hammond R. K., White D. C., J. Chromatogr., 45, 46 (1969).
67. Manes J. D., Fluckiger H. B., Schneider D. L., J. Agric. Food Chem., 20, 1130 (1972).
68. Billeter M., Martius C., Biochem., Z., 334, 304 (1961).
69. Wagner H., Hoerhammer L., Dengler D., J. Chromatogr., 7, 211 (1962).
70. Wagner H., Chromatogr. Symp., 2nd, Brussels, 1962, 243.
71. Wagner H., Dengler B., Biochem., Z., 336, 380 (1962).
72. Threlfall D. R., Goodwin T. W., Biochim. Biophys. Acta, 78, 532 (1963).
73. Eck H., Trebst A., Z. Naturforsch., 18b, 446 (1963).
74. Henninger M. D., Crane F. L., Biochemistry, 2, 1168 (1963).
75. Henninger M. D., Dilley R. A., Crane F. L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 237 (1963).
76. Drews B., Specht H., Hinze H.-J., Monatsschr. Brau., 20, 7 (1967).
77. Ikan R., Gottlieb R., Bergmann E. D., Ishay J., J. Insect. Physiol., 14, 1215 (1968).
78. Gaenshirt H., Malzacher A., Naturwissenschaften, 47, 279 (1960).
79. Ishikawa S., Katsui G., Bitamin, 29, 203 (1964).
80. Huettnerrauch R., Klotz L., Mueller W., Z. Chem., 3, 193 (1963).
81. Diittmann J., Dtsch. Gesundheitsw., 22, 1217 (1967).
82. Thielemann H., Z. Chem., 13, 15 (1973).
83. Thielemann H., Sci. Pharm., 42, 94 (1974).
84. Petrović S. E., Belia B. E., Vukajlović D. B., Anal. Chem., 40, 1007 (1968).
85. Chiang H.-C., Lin Y., Wu Y.-C., J. Chromatogr., 45, 161 (1969).
86. Hashmi Manzur-ul-Haque, Chughtai F. R., Chughtai M. I. D., Microchim. Acta, 1969, 951.
87. Bičan-Fišter T., Dražin V., J. Chromatogr., 77, 389 (1973).
- 87a. Hashmi M. H., Chughtai F. R., Adil A. S., Qureshi T., Microchim. Acta, 1967, 111.
88. Nuttall R. T., Bush B., Analyst (London), 96, 875 (1971).
89. David S., Hirshfeld H., Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, 1011.
90. Ono T., Hara M., Bitamin, 33, 512 (1966).
91. Chuang H.-P., Chiang H.-C., Wang K.-T., J. Chromatogr., 41, 487 (1969).
92. Dwivedi B. K., Arnold R. G., Libbey L. M., J. Food Sci., 37, 689 (1972).
93. Dwivedi B. K., Arnold R. G., J. Food Sci., 37, 886 (1972).
94. Ariaey-Nejad M. R., Balaghi M., Baker E. M., Sauberlich H. E., Am. J. Clin. Nutr., 23, 764 (1970).
95. Nuernberg E., Deut. Apoth.-Ztg., 101, 268 (1961).
96. Deyl Z., Rosmus J., J. Chromatogr., 8, 537 (1962).
97. Дементьева Е. Н., Дробинская Н. А., Ионова Л. В., Карпейский М. Я., Флорентьев В. Л., Биохимия, 33, 350 (1968).
98. Ahrens H., Korytnyk W., Anal. Biochem., 30, 413 (1969).
99. Colombini C. E., McCoy E. E., Anal. Biochem., 34, 451 (1970).
100. Cima L., Mantovan R., Farmaco Ed. Prat., 17, 473 (1962); Chem. Abstr., 57, 16986 (1962).
101. Covello M., Schettino O., Farmaco Ed. Prat., 19, 38 (1964).

102. Ono T., Kawasaki M., *Bitamin*, **30**, 280, (1964); *Chem. Abstr.*, **62**, 1957 (1965).
103. Popova Ya., Popov Ch., Ilieva M., *J. Chromatogr.*, **24**, 263 (1966).
104. Popova Va., Popov Ch., Ilieva M., *J. Chromatogr.*, **21**, 164 (1966).
105. Sasaki T., *J. Chromatogr.*, **24**, 452 (1966).
106. Covello M., Schettino O., *Farmaco Ed. Prat.*, **20**, 581 (1965).
107. Smith E. C., Metzler D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3285 (1963).
108. Treadwell G. E., Jr., Metzler D. E., *Anal. Biochem.*, **46**, 261 (1972).
109. Haworth C., Oliver R. W. A., Swaile R. A., *Analyst (London)*, **96**, 432 (1971).
110. Ismaiel S. A., Yassa D. A., *Analyst (London)*, **98**, 1 (1973).
111. Nuernberg E., *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **101**, 142 (1961).
112. Thielemann H., Papke M., *Sci. Pharm.*, **40**, 210 (1972).
113. Washuettl J., *Microchim. Acta*, **1970**, 621.
114. Ismaiel S. A., Yassa D. A., *Analyst (London)*, **98**, 816 (1973).
115. Brunink H., Wessels E. J., *Analyst (London)*, **97**, 258 (1972).
116. Mlodecka J., Sekowska B., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **13**, 159 (1968).
117. Hasselquist H., Jaarma M., *Acta Chem. Scand.*, **17**, 529 (1963).
118. Strohecker R., Jr., Pies H., *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, **118**, 394 (1962).
119. Guven K. C., Alpar O., *Eczacilik Bul.*, **9**, 160 (1971). *Chem. Abstr.*, **69**, 24366z (1968).
120. Huettenrauch R., Keiner I., *Pharmazie*, **23**, 157 (1968).
121. Iyer H. R. S., Apte B. K., *Indian J. Pharm.*, **31**, 58 (1969).
122. Spinelli P., Ciuffi M., *Bol. Chim. Farm.*, **105**, 849 (1966).
123. Popova Y., Kovacheva E., *Nauch. Tr. Vissh. Inst. Khranit. Vkusova Prom., Plovdiv*, **16**, 323 (1969); *Chem. Abstr.*, **77**, 168685r (1972).
124. Popova Y., Kovacheva E., *Nauch. Tr. Vissh. Inst. Khranit. Vkusova Prom., Plovdiv*, **17**, 351 (1970); *Chem. Abstr.*, **77**, 52391n (1972).
125. Guven K. C., Pekin O., *Eczacilik Bul.*, **8**, 113 (1966); *Anal. Abstr.*, **14**, 5689 (1967).
126. Kreuzig F., *Z. Anal. Chem.*, **255**, 126 (1971).
127. Copenhaver J. H., O'Brien K. L., *Anal. Biochem.*, **31**, 454 (1969).
128. Brown J. P., Davidson G. E., Scott J. M., *J. Chromatogr.*, **79**, 195 (1973).
129. Zivanov-Stakič D., Radulović D., Ilić G., *Arhiv. Farm. (Belgrade)*, **25**, 85 (1975); *Chem. Abstr.*, **84**, 79758u (1976).
130. Frank M. J., Trager P. G., Johnson J. B., Rubin S. H., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 108 (1973).
131. Sherma J., Dorflinger L., *Am. Lab.*, **8**, 63 (1976).
132. Sullivan G., Brady L. R., *Lloydia*, **28**, 68 (1965).
133. Skidmore W. D., Entenman C., *J. Lipid Res.*, **3**, 471 (1962).
134. Radecka C., Genest K., Hughes D. W., *Arzneim.-Forsch.*, **21**, 548 (1971).

## РАЗЛИЧНЫЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

## 1. МИКОТОКСИНЫ

Микотоксинами называют ядовитые соединения, вырабатываемые плесневыми грибами. Мейер и Лейстнер [1] утверждают, что существует около 240 видов токсикогенных плесневых грибов, и в своей статье они привели список 75 таких грибов. Фишбейн и Фальк [2] опубликовали обзор по хроматографии микотоксинов, Столоф [3] обобщил работы по методам анализа этих соединений, а Шуллер и др. [4] рассмотрели различные методы исследования афлатоксинов.

Из микотоксинов наиболее известны афлатоксины, вырабатываемые видами *Aspergillus flavus* и *A. parasiticus*, а также *A. ochraceus* и *Rhizopus* [5]. В настоящее время известны афлатоксины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>2а</sub>, В<sub>3</sub> (паразитикол), R<sub>0</sub> (афлатоксол), G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>2а</sub>, GM<sub>1</sub>, GM<sub>2а</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>2а</sub>, RB<sub>1</sub>, RB<sub>2</sub> и P<sub>1</sub>. Афлатоксин P<sub>1</sub>, имеющий структуру фенола, образуется в процессе метаболизма афлатоксина В<sub>1</sub>, его не удалось непосредственно идентифицировать при анализе культур плесневых грибов; В<sub>2а</sub> — это гемиацеталь афлатоксина В<sub>1</sub>; M<sub>1</sub> — метаболит В<sub>1</sub>, а M<sub>2</sub> — метаболит В<sub>2</sub>. Поскольку известно, что все эти вещества канцерогенны, большинство работ посвящено разработке методов обнаружения этих соединений и определения их содержания в пищевых продуктах и кормах. Для этой цели, в частности, широко используется тонкослойная хроматография.

Афлатоксины можно экстрагировать хлороформом, смесями вода—хлороформ (1:10), хлороформ—метанол—вода (8:1:103) [6], метанолом [7], смесями диметилсульфоксид—вода (1:1) и диметилформамид—вода (1:1) [8], ацетоном [9], 70 %-ным ацетоном [10] и смесью хлороформ—метанол (9:1) [11]. Пробы, содержащие большие количества жира или других мешающих анализу веществ, необходимо предварительно, до нанесения на тонкие слои, очищать [10, 12—15]. Иин [16] рекомендовал применять для экстрагирования афлатоксинов смесь ацетонитрил—вода (9:1), потому что этот экстракт не содержит мешающих определению примесей, в том числе масел; если этот экстракт содержит вещества, осаждаемые соединениями свинца, то можно воспользоваться необходимым количеством ацетата свинца. Браун и др. [17] испытали ряд



методов экстрагирования афлатоксинов из тканей животных и нашли, что чувствительность последнего метода недостаточна. Они предпочитают экстрагировать афлатоксины метанолом по методу Якобсона и др. [7] и затем очищать этот экстракт. Альтенкирк [18] очищал пробы методом ТСХ. После нанесения пробы на слой силикагеля размером 6×14 см пластинку элюируют эфиром параллельно ее короткой стороне, затем этот растворитель удаляют, выдерживая пластинку 15 мин в сушильном шкафу при 80°C, после чего под прямым углом к предыдущему направлению, т. е. параллельно длинной стороне пластинки, проводят элюирование смесью хлороформ—трихлорэтилен—трет-бутанол—муравьиная кислота (85:10:4:1). Если часть пластинки, где должен быть афлатоксин, недостаточно освобождена от примесного фона, проводится повторное элюирование эфиром в направлении, параллельном короткой стороне. Лейстнер [19] удалял мешающие примеси следующим способом. Пробу (бензольные экстракты пищевых продуктов) наносят в виде полоски посередине алюминиевой пластинки (20×20 см) со слоем силикагеля и затем элюируют дважды бензолом и дважды эфиром. Афлатоксины при этом не мигрируют. Далее верхнюю часть слоя на расстоянии 2 см от стартовой линии отрезают, поворачивают пластинку на 180° и элюируют смесью хлороформ—трихлорэтилен—амиловый спирт—уксусная кислота (80:15:4:1). Если содержание афлатоксинов в пробе невелико, элюирование этой смесью повторяют еще раз. Краузер [20] установил, что метаболит *Macrophomina phaseoli* (Маубл) Эшби при хроматографировании на силикагеле смесью хлороформ—метанол (19:1) ведет себя так же, как афлатоксин В и обнаруживает ярко-синюю флуоресценцию при облучении светом с длиной волны 363 нм. Другой метаболит флуоресцирует зеленым цветом и концентрируется при  $R_f$  от 0,6 до 0,75. Ни один из этих метаболитов не обнаруживает токсических свойств при испытании на мышах и утятах, поэтому, если в пробе должен содержаться афлатоксин В и если в указанных условиях в области  $R_f$  от 0,6 до 0,75 наблюдается зеленая флуоресценция, Краузер рекомендует повторить хроматографирование эфиром. При этом пятно метаболита *M. phaseoli* сместится в область  $R_f$  0,9, а зеленое флуоресцирующее пятно — в область  $R_f$  1,0, в то время как афлатоксин В останется при  $R_f$  0,5. Робертс и Паттерсон [20а], очищая микотоксины, проводили, кроме того, диализ.

Афлатоксины наносят на пластинки в основном в виде раствора в хлороформе, однако Столоф и др. [21] рекомендуют использовать для этой цели бензол. Эти авторы считают, что бензол предпочтителен по следующим причинам: а) из-за более высокой температуры кипения бензола возникает меньше за-

труднений при переносе и нанесении проб; б) пятна получаются меньшими и более компактными; в) на величины  $R_f$  в хлороформе может оказать влияние наличие примеси спирта, вводимого в качестве стабилизатора. Растворяющую способность бензола можно улучшить, добавляя к нему 2 % ацетонитрила; пятна и при этом остаются компактными [22].

В качестве адсорбента для афлатоксинов наиболее предпочтителен силикагель. Хезкоут и Хибберт [23] испытали различные марки силикагеля с тем, чтобы выяснить, какая из них дает наилучшее разрешение. Как оказалось, кизельгель G (Merck), который ранее чаще всего использовался, уступает другим маркам силикагеля; самые лучшие результаты получены с силикагелем марки SilicAR TLC-7G (Mallinckrodt).

Элюируют афлатоксины различными смесями растворителей: хлороформ—метанол (97:3), хлороформ—метанол—уксусная кислота (94,5:5:0,5), ацетон—хлороформ (9:1 и 3:17), бензол—уксусная кислота—метанол (90:5:5), а также хлороформ—ацетон—2-пропанол (33:6:1 и 34:5:1). Опыты показали, что растворяющие системы, в состав которых входят хлороформ и метанол, чувствительны к изменениям влажности и температуры, поэтому ряд исследователей занимались поисками более надежных растворяющих систем. Хорошим элюирующим растворителем, но только при оптимальных влажности и температуре оказалась смесь бензол—этанол—вода (46:35:19) [23]. Стаблфилд и др. [24] считают самой лучшей элюирующей системой для разделения афлатоксинов  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $M_1$  и  $M_2$  смесь изопропанол—ацетон—хлороформ (5:10:85). Наилучшее разрешение при разделении  $M_1$  и  $M_2$  дает смесь *n*-амиловый спирт—ацетон—хлороформ (1:1:8), но в этом случае другие афлатоксины перемещаются вместе с фронтом растворителя. Хорошее разделение афлатоксина  $G_{2a}$  и более полярных производных  $M_{2a}$  и  $GM_{2a}$  достигается со смесью толуол—этил-ацетат—ацетон—уксусная кислота (50:35:15:2) [23]; при этом образуются небольшие количества ацетильных производных, которые можно отделить, элюируя смесью хлороформ—метанол (97:3).

Редди и др. [25] нашли, что смесь толуол—изоамиловый спирт—метанол (90:32:3) позволяет четко разделить афлатоксины  $B_1$  ( $R_f$  0,56),  $B_2$  ( $R_f$  0,48),  $G_1$  ( $R_f$  0,42) и  $G_2$  ( $R$  0,34); повторное элюирование этим же растворителем улучшает разрешение. Энгстром [26] указал три элюирующих системы, дающих более четкое разрешение, чем обычно применяемые растворители: смесь метиленхлорид—трихлорэтилен—*n*-амиловый спирт—муравьиная кислота (80:15:4:1) (элюирование которой проводится дважды, причем с этим растворителем обращается обычная последовательность  $B_2$  и  $G_1$ ), хлороформ—

трихлорэтилен—*n*-амиловый спирт—муравьиная кислота (80:15:4:1) (ею элюируют тоже дважды) и смесь кислот—*трет*-бутанол—уксусная кислота (94:5:1). Последняя смесь предназначена для разделения методом распределительной хроматографии на пропитанном смесью *трет*-бутанол—муравьиная кислота—вода (10:1:25) и высушенном на воздухе в течение 30 мин слое из смеси силикагелей H и G-HR, взятых в соотношении 1:1.

Чтобы улучшить разрешение, применяют также двумерное хроматографирование. В частности, используют такие комбинации растворителей: хлороформ—ацетон (9:1) и диэтиловый эфир—метанол—вода (188:9:3) [27]; ацетон—хлороформ (1:9) и толуол—этилацетат—90 %-ная муравьиная кислота (5:4:1) [28]; бензол—уксусная кислота—метанол (90:5:5) и ацетон—хлороформ (1:9) [29]; ацетон—хлороформ (1:9) и этилацетат—изопропанол—вода (10:2:1) [30], а также эфир—метанол—вода (188:9:3) и хлороформ—ацетон—изопропанол (85:10:5) [31]. Де Зесув и Лиллард [32], чтобы улучшить разрешение афлатоксинов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub>, программировали изменение состава газовой фазы.

Этоксихин вводят в качестве антиоксиданта в некоторые пищевые продукты, корма для животных и фураж, и он может присутствовать в экстрактах афлатоксинов. При элюировании некоторыми растворителями этоксихин может образовать флуоресцирующие пятна, одно из которых характеризуется  $R_f$ , близким к  $R_f$  афлатоксина В<sub>1</sub>. Стефаньяк [33], а также Исак и др. [34] исследовали, в каких условиях появляются такие пятна, и предложили несколько методов, позволяющих избежать их появления.

Квон и Айрес [35] проводили очистку G<sub>1</sub> и обнаружили, что строение слоев силикагеля замедляется, если эти слои пропитаны EDTA, а в состав растворителей введен в качестве антиоксиданта бутилокситолуол. Однако и в этом случае разделение афлатоксинов необходимо проводить при слабом освещении.

Андреллос и Рейд [36] разработали три дополнительных способа обнаружения афлатоксинов В<sub>1</sub> и G<sub>1</sub>. После препаративного разделения методом ТСХ пятна соединений элюируют с пластинки метанолом, затем испаряют растворитель и проводят реакцию полученного остатка с одним из следующих трех составов: 1) 0,2 мл ледяной уксусной кислоты с одной каплей бесцветного тионилхлорида; 2) 0,2 мл ледяной уксусной кислоты с одной каплей 90 %-ной муравьиной кислоты (*reagent-grade*); 3) три капли безводной трифторуксусной кислоты. После проведения реакции (5 мин для составов 1 и 2 и 60 с для состава 3) смесь упаривают при слабом нагревании в токе азота

досуха. Остаток растворяют в хлороформе, наносят на пластинку с силикагелем и элюируют смесью метанол—хлороформ (5:95) в закрытой камере. При облучении длинноволновым УФ-светом продукты реакции дают характерные флуоресцирующие пятна. Столоф [37] модифицировал эти методы, добавив очистку на колонке с силикагелем. Пжибыльский [38] использовал реакцию с трифторуксусной кислотой как метод обнаружения афлатоксинов *in situ* и получил хорошие результаты. Поланд и др. [39], чтобы подтвердить результаты разделения, нагревали разделенные соединения с концентрированной соляной кислотой и водой (до образования аддуктов с водой) или с соляной кислотой и уксусным ангидридом (до образования ацетатов) Эшур и Чу [40, 41] разработали проверочный метод, подтверждающий наличие афлатоксинов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>: они восстанавливают эти афлатоксины боргидридом натрия до соответственно афлатоксинов RB<sub>1</sub> и RB<sub>2</sub>. При элюировании смесью хлороформ—этилацетат (1:3) получены следующие величины  $R_f$ : В<sub>1</sub> 0,54, RB<sub>1</sub> 0,71, В<sub>2</sub> 0,46 и RB<sub>2</sub> 0,65. Стэк и др. [42] подтверждали правильность идентификации афлатоксина М<sub>1</sub>, обрабатывая пятно этого афлатоксина 15 мин смесью пиридин—уксусный ангидрид (1:1) при комнатной температуре, и хроматографировали полученное производное соединение. Хеддон и др. [43] использовали в этих целях масс-спектрометрию. Подтвердить наличие афлатоксина можно также по его воздействию на куриные зародыши [44] Клементс [45] подтверждал наличие афлатоксина В<sub>1</sub>, действуя им на *Bacillus megaterium*, рост которых при этом тормозится.

Лучший метод количественного определения афлатоксинов—флуориметрия *in situ* [46—49]. Чувствительность этого метода может достигать 0,1—0,2 нг [50—51]. Берман и Заре [52] использовали для количественного определения субнанограммовых количеств афлатоксинов флуоресцентный анализ с лазерным источником. Кирмейер и Гроль [53] определяли содержание афлатоксина В<sub>1</sub> спектрофотометрически, определяя при 363 нм поглощение элюата, полученного при элюировании с пластинки разделенного вещества.

Дурачкова и др. [54] указали, что известно более 100 микотоксинов, так что изложение всех работ по тонкослойной хроматографии, выполненных с этими соединениями, чрезмерно увеличило бы объем книги.

После афлатоксинов наиболее исследованными микотоксинами являются охратоксины. Охратоксины А, В и С хроматографировали на силикагеле смесью бензол—уксусная кислота (3:1) и получили следующие величины  $R_f$ : 0,5; 0,35 и 0,65 соответственно [55]. После опрыскивания 0,1 н. гидроксидом

натрия пятна этих ократоксинов дают синюю флуоресценцию при облучении УФ-светом. При элюировании смесью метанол—уксусная кислота—бензол (5:5:90)  $R_f$  ократоксина А равна 0,65, а  $R_f$  ократоксина В 0,5 [56]. Чтобы подтвердить правильность идентификации этих соединений, их переводили в соответствующие этиловые эфиры,  $R_f$  которых в той же самой элюирующей системе равны соответственно 0,8 и 0,7. Можно также провести микробиологическое исследование [57]. Для разделения смесей афлатоксинов, ократоксинов, зеареленона, стеригматоцистина и патулина, а также для обнаружения этих соединений Столоф и др. [58] использовали смеси бензол—метанол—уксусная кислота (90:5:5), гексан—ацетон—уксусная кислота (18:2:1), хлороформ—уксусная кислота—диэтиловый эфир (17:1:3) и хлороформ—ацетон (9:1). Они проводили хроматографирование на четырех слоях силикагеля, причем с первыми двумя растворителями одномерное, а с двумя следующими — двумерное разделение, используя третий и четвертый растворители для элюирования соответственно в первом и во втором направлениях. Для обнаружения различных соединений применяли как нефлуоресцирующие, так и флуоресцирующие слои.

Стеригматоцистин выделяли из проб зерновых хроматографированием смесью бензол—уксусная кислота—метанол (90:5:5) и подтверждали наличие этого микотоксина, получая его ацетаты или продукты кислотного гидролиза с последующим разделением этих производных методом ТСХ [59].

Методом ТСХ обнаружен ряд других микотоксинов, в том числе биссохламовая кислота в пищевых продуктах [60], трикотецены [61], виделиатоксины [62] и граянотоксины в меде [63], тремортины в сельскохозяйственных продуктах [64], рубратоксин В в кукурузе [65], цитринин [66], патулин [67—71], цитреовиридин [72],  $\beta$ -нитропропионовая кислота [73], токсин хоплонемертина [74], стеригматоцистин и его изомеры [75], а также алтенуен и его производные [76].

Стейн [77] определил величины  $R_f$  11 микотоксинов на слоях силикагеля, пропитанных 0,4 н. щавелевой кислотой, элюируя пробу смесью хлороформ—метилизобутилкетон (4:1). В качестве обнаруживающего реактива он использовал концентрированную серную кислоту, после обработки которой пластинку прогревали 10 мин при 110°C; в качестве обнаруживающего реактива рекомендован также 1%-ный раствор сульфата церия в 6 н. серной кислоте, а также некоторые специфические реагенты для проведения цветных реакций. Робертс и Паттерсон [20а] разделяли 12 микотоксинов на пластинках с силикагелем G-HR; они привели величины  $R_f$ , полученные с 9 системами элюирующих растворителей.

Дурачкова и др. [54] привели величины  $R_f$  37 микотоксинов, полученные на силикагеле G и на листьях силуфола с 8 системами элюирующих растворителей. Эти авторы описали 5 способов обнаружения соединений. Все эти соединения можно обнаружить в УФ-свете после опрыскивания реактивом, содержащим *n*-анисовый альдегид (0,5 мл альдегида + 70 мл метанола + 10 мл уксусной кислоты + 5 мл концентрированной серной кислоты) и последующего 8—20-минутного нагревания при 130°C (для листков силуфола 60°C), однако с целью контроля целесообразно подтвердить тем или иным методом полученные результаты. Ряд величин  $R_f$  приведен в табл. 32.1. Те же авторы описали биоавтографический метод обнаружения микотоксинов, основанный на использовании личинок *Artemia salina* [78]. Гедек [79] описал биологические методы обнаружения микотоксинов, в том числе применение куриных зародышей и культур клеток.

## 2. КЛЕИ

Дитль [80] хроматографировал различные клеи, нанося их пробы в виде 0,1—5%-ных растворов в неполярном растворителе на слои силикагеля G или оксида алюминия G и элюируя их 90%-ным бутанолом. После разделения соединений он опрыскивал хроматограммы серной кислотой и затем нагревал до 120°C. Чувствительность этого метода — 0,01 мкг клея.

## 3. АНТИОКСИДАНТЫ

Антиоксиданты добавляют не только в пищевые продукты, чтобы замедлить или предотвратить окисление жиров и других веществ, но и во многие промышленные материалы, в частности в каучуки и пластмассы, чтобы предохранить их от старения. Андерсон и др. [81] использовали ТСХ для исследования соотношения между уменьшением содержания ВНТ (3,5-дигрет-бутил-4-окситолуола) и ВНА (3-трет-4-оксианизола) в концентратах для быстрого приготовления каш и увеличением содержания пероксидов в этих продуктах. Продукты окисления антиоксидантов эти авторы выделяли на слоях силикагеля, элюируя пробы смесью гексан—эфир (90:10).

Пытаясь обнаружить синтетические антиоксиданты в пищевых маслах, Зеер [82, 83] исследовал 24 таких продукта. Он проводил разделение методом одномерной хроматографии на силикагеле G, используя как элюирующий растворитель хлороформ, и двумерной хроматографии, элюируя пробу хлороформом в одном направлении и бензолом — в другом. Для обнаружения зон Зеер применял несколько реагентов. Можно опрыскивать

Величины  $R_f \times 100$  некоторых микрококсов, полученные на силикагеле [54] а

Микрокочин	Растворители б							Ж	З
	А	Б	В	Г	Д	Е			
$\gamma$ -Лактон 4-ацетиамидо-4-окси-2-бутеновой кислоты	12,0	11,5	2,5	57,0	5,0	8,0	7,0	55,0	
Афлатоксин В <sub>1</sub>	28,0 <sup>в</sup>	31,5 <sup>в</sup>	19,5 <sup>в</sup>	80,5 <sup>в</sup>	22,5 <sup>в</sup>	32,5 <sup>в</sup>	31,5 <sup>в</sup>	61,5 <sup>в</sup>	
Афлатоксин В <sub>2</sub>	30,0	18,0	14,0	80,0	9,0	33,0	2,0	61,0	
Афлатоксин G <sub>1</sub>	19,0 <sup>в</sup>	19,0 <sup>в</sup>	13,5 <sup>в</sup>	84,5 <sup>в</sup>	12,0 <sup>в</sup>	25,0 <sup>в</sup>	20,0 <sup>в</sup>	50,0 <sup>в</sup>	
Афлатоксин G <sub>2</sub>	22,5	8,0	8,0	78,0	4,5	17,0	11,0	51,5 <sup>в</sup>	
Афлатоксин M <sub>1</sub>	21,5	15,5	10,0	78,5	0,0	7,5	6,5	64,0	
Алтеуен	24,0	33,0	7,0	66,0	3,5	6,5	12,0	83,0	
Алтернариол	30,5	65,5	17,0	83,0	32,0	28,5	58,0	95,0	
Монометиловый эфир алтернариола	57,5	72,5	33,0	88,0	67,0	56,5	73,5	93,0	
Аспергилловая кислота	67—80 г	62—82 г	35—57 г	74—94 г	4—21 г	33—71 г	65—86 г	92,0 г	
Цитринин	2—25 г	0—48 г	0—5 г	0—24 г	0—13 г	0—20 г	37,0 <sup>в</sup>	72,0 <sup>в</sup>	
Цитреовиридин	25,5 <sup>в</sup>	30,0 <sup>в</sup>	9,5 <sup>в</sup>	80,0 <sup>в</sup>	1,0 <sup>в</sup>	9,5 <sup>в</sup>	8,0 <sup>в</sup>	86,0 <sup>в</sup>	
Цианени	18,0	27,0	5,0	64,5	0,0	0,0	2,5	90,0	
Дицетоксисцирленол	39,0	30,5	19,5	90,0	14,5	34,5	27,5	82,0	
N,N'-Дибензилэтилен-диамин	31,0	27—44 г	2,0	31,0	0,0	0,0	21,0	69,0	
Фюзаровая кислота	23,5	11,5	0—11 г	70,0	0—12 г	0—14 г	12,5	58,0	
Глиотоксин	50,0	42,5	31,5	85,0	18,5	32,0	30,5	81,0	
Гризеофульвин	40,5	46,0	19,0	91,0	24,0	38,0	43,0	66,5	
Фумитацин	52,5	53,0	28,0	89,0	15,0	29,0	50,0	93,5	
Койевая кислота	12,5	15,0	2,5	52,0	0,0	2,0	6,0	65,0	
Леогеоскирин	0—45 г	60,0 <sup>в</sup>	0—12 г	0—46 г	0—17 г	0—15 г	0—38 г	0—100 г	
Микофеноловая кислота	57,0	65,5	29,5	81,5	29,0	42,5	71,5	87,0	
Ниваленол	7,0	5,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	67,5	
Охратоксин А	52,0	59,5	34,5 <sup>в</sup>	79,0	0—11 г	0—23 г	56,5	95,0	
Охратоксин В	41,0	46,0	12,0 <sup>в</sup>	65,0	0,0	2,0	33,5	79,0	
Охратоксин С	80,0	72,0	75,0	91,0	53,0 <sup>в</sup>	73,5	86,0	87,0	
Пагулин	34,0	37,0	22,0	72,0	20,5	25,0	30,0	78,0	
Пенициллиновая кислота	32,0	43,0	18,5	76,0	18,5	22,5	31,0	88,5	
Рубратоксин В	0,0 <sup>в</sup>	0,0 <sup>в</sup>	0,0 <sup>в</sup>	34,0 <sup>в</sup>	0,0 <sup>в</sup>	0,0 <sup>в</sup>	0,0 <sup>в</sup>	84,0 <sup>в</sup>	
Ругулозин	0—34 г	51,5 <sup>в</sup>	1,5	0—38 г	0—4 г	0—5 г	27,5 <sup>в</sup>	92,0 <sup>в</sup>	
Секанювая кислота	45,0 <sup>в</sup>	55,5	0,0	54,0 <sup>в</sup>	0,0	5,0	20—37 <sup>в</sup>	72,0 <sup>в</sup>	
Стеригмаоцистин	67,5	71,0	59,0	93,0	71,5	74,0	78,0	84,5	
Терревая кислота	55,0	66,0	55,0	79,0 <sup>в</sup>	51,0	49,0	63,0	90,5	
Токсин Т-2	43,5	32,0	16,5	92,0	16,0	38,5	38,5	81,0	
Трихотецин	68,5	55,5	43,0	92,0	63,0	73,5	69,5	81,5	
Токсин Virgificatum	0—12 г	0—41 г	0,0	0—12 г	0,0	0,0	0—17 г	57,5 <sup>в</sup>	
Зеараленон	56,5	58,5	40,0	88,5	61,5	61,5	64,0	84,0	

а В оригинале приведены также величины  $R_f$ , полученные на листках «сифола», и указаны цветные реакции.

б Растворители: А — бензол—метанол—уксусная кислота (24 : 2 : 1); Б — толуол—этилацетат—90 %-ная муравьиная кислота (6 : 3 : 1); В — бензол—этанол (95 : 5); Г — хлороформ—метанол (4 : 1); Д — хлороформ—метилизобутилкетон (4 : 1); Е — хлороформ—ацетон (9 : 1); Ж — хлороформ—уксусная кислота—диэтиловый эфир (17 : 1 : 3); З — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 4).

в Образование «хвостов».

г Вытянутое пятно. Указанные числа соответствуют верхнему и нижнему краям пятна.

сухие хроматографические пластинки 20 %-ным раствором фосфолибденовой кислоты в метаноле. Через 1 или 2 мин антиоксиданты обнаруживаются в виде синих пятен, а после дополнительной обработки пластинок парами аммиака они обнаруживаются в виде сине-фиолетовых или зеленых пятен на чисто белом фоне. Антиоксиданты с низкой восстанавливающей способностью обнаруживаются только после 10-минутного нагревания пластинок при 120°C. Другой метод идентификации — опрыскивание пластинок 1 %-ным раствором 2,6-дихлорбензохинонхлоримида в этаноле. Опрысканные пластинки помещают на 15 мин в камеру с нейтральной атмосферой. При этом на хроматограмме появляются окрашенные зоны. Иногда пластинки дополнительно опрыскивают 2 %-ным раствором буры в 40 %-ном этаноле. В результате такой обработки пятна окрашиваются в характерные цвета. В табл. 32.2 перечислен ряд таких реакций. Мейер [84] исследовал антиоксиданты, добавляемые к жирам и содержащим жиры пищевым продуктам. Он проводил разделение на слоях смеси силикагеля и кизельгура (25.5), элюируя пробу смесью гексан—уксусная кислота (2.0,5). Ишикава и Кацуи [85] разделяли антиоксиданты, добавляемые к растительным маслам, на слоях силикагеля и полиамида. Йонас [86] привел величины  $R_f$  некоторых распространенных антиоксидантов, полученные с разными растворителями, причем самое лучшее разделение наблюдалось при хроматографировании на пропитанном парафином силикагеле с 75 %-ным метанолом. Ценц [87] также анализировал природные и синтетические антиоксиданты. В табл. 32.3 даны величины  $R_f$  некоторых широко распространенных антиоксидантов, а в табл. 32.4 — величины  $R_f$  галлатов, разделенных на ацетилированной целлюлозе [88] и полиамиде [89]. Давидек и Покорный [90, 91] разделили ряд фенольных антиоксидантов на незакрепленных слоях полиамида (табл. 32.5).

Уанг и Чоу [92] разделяли ВНА, ВНТ, стерил-, цетил-, лаурил-, амил- и пропилгаллаты, а также этилпротокатехат на листках со слоем полиамида, элюируя пробы смесями петролейный эфир (30—70°C)—бензол—ацетон (8:2:5) и ацетон—этанол—вода (4:1:2). Пятна разделенных соединений обнаруживали 0,25 %-ным раствором флуоресцеина натрия в смеси диметилформамид—этанол (5:100) и смесью бром—тетрахлорид углерода (1:20). Эти авторы получили следующие величины  $R_f$  (в скобках указана чувствительность определения): 0,98, 0,33 (4 мкг); 0,96, 0,46 (1 мкг); 0,64, 0,08 (1 мкг); 0,48, 0,20 (2,5 мкг); 0,37, 0,30 (1 мкг); 0,17, 0,49 (0,5 мкг); 0,09, 0,53 (0,05 мкг) и 0,31, 0,57 (1 мкг). Ли [93] применял слои смеси полиамида и силикагеля (8:15) и в качестве элюирующего растворителя использовал смесь уксусной кислоты с бензолом,

Таблица 32.2

Цветные реакции, применяемые для обнаружения ряда антиоксидантов [82]<sup>a</sup>

Соединение	Сокращенное обозначение	Фосфолибденовая кислота	2,6-Дихлорхинонхлоримид	
			нейтральный	опрыскивание раствором буры
$\alpha$ -Токоферол		+	Желто-коричневая	Желто-коричневая
Ацетат $\alpha$ -токоферола		—	Розовая	(Розовая)
2,2,5,6,7-Пентаметил-6-оксихроман	PHMC	+	Коричнево-желтая	Желто-коричневая
Пропилгаллат	PG	+	Коричневая	Серо-коричневая
Октилгаллат	OG	+	"	"
Додецилгаллат	DG	+	"	"
2- <i>трет</i> -Бутил-4-оксанизол	BNA	+	Ржаво-коричневая	Фиолетовая
3- <i>трет</i> -Бутил-4-оксанизол	BNA	+	"	"
2,5-Ди- <i>трет</i> -бутил-4-оксанизол	DBNA	+	Пурпурная	"
3- <i>трет</i> -Бутил-4-окситолуол	BNT	+	Оранжевая	Оранжевая
3,5-Ди- <i>трет</i> -бутил-4-окситолуол	JONOL	+	Желтая	(Ярко-желтая)
Нордигидрогваяреговая кислота	NDGA	+	Фиолетовая	Коричнево-фиолетовая
Смола Guaiacum	GH	+	Оливково-зеленая	Оливково-зеленая
Аскорбилпальмитат	AP	+	Красная	Ярко фиолетовая
Монометиловый эфир гидрохинона	HA	+	Красно-фиолетовая	Сине фиолетовая
4- <i>трет</i> -Бутоксианизол	BOA	+	То же	"
Моноглицеридцитрат	MGC	+ <sup>6</sup>	Розовая	Ярко-фиолетовая
N-Лаурил- <i>n</i> -фенетидин	Sucopox 12	+	Ярко-розовая	Ярко-розовая
N-Стеарил- <i>n</i> -фенетидин	Sucopox 18	+	"	"
N,N-Дифенил- <i>n</i> -дифенилендиамин	DPPD	+	Серо-коричневая	Серо-коричневая
Тетраэтилтиурамдисульфид	TETD	+	Ржаво-коричневая	Коричневая

Продолжение табл. 32 2

Соединение	Сокращенное обозначение	Фосфолибденовая кислота	2,6-Дихлорхинонхлоримид	
			нейтральный	опрыскивание раствором буры
$\beta,\beta'$ -Тиодипропионовая кислота	TDP	+	Ярко-коричневая	Оранжевая
4-( <i>n</i> -Бутилмеркапто)бутанол	BMB	+	Канареечно-желтая	Ярко-коричневая
2,4,6-Три- <i>трет</i> -бутилфенол	TBP	+	Оранжевая	Пурпурная

<sup>a</sup> С разрешения автора и Industrieverlag von Hernhanssen KG.

<sup>b</sup> Цветная реакция идет при нагревании.

хлороформом или тетрахлоридом углерода (1:4). Обнаруживающим реактивом служил аммиачный раствор нитрата серебра. Уанг и Чоу разделили 8 антиоксидантов.

Дениэльс и др. [94] исследовали природные фенольные антиоксиданты, содержащиеся в овсе.

Количественный анализ с помощью метода ТСХ проводился [95—97] при определении содержания ВМА, ВНТ, пропилгаллата (PG) и нордигидрогваяретовой кислоты (NDGK) в свином сале. Сахасрабудхе [95] экстрагировал антиоксиданты из гексанового раствора жира 80 %-ным этанолом и ацетонитрилом. Для разделения смесей антиоксидантов он применял двумерную хроматографию с бензолом и ацетонитрилом в качестве элюирующих растворителей. По окончании разделения он элюировал соединения с пластинки с выходами 82—101 % и определял содержание антиоксидантов колориметрически. Аmano и др. [96] определяли содержание ВНА в пищевых маслах методом измерения площади пятен. Масла перегоняли с водяным паром и экстрагировали антиоксидант из дистиллата тетрахлоридом углерода. Хроматографирование проводили на пластинках с силикагелем, элюируя пробы смесью гексан—тетрахлорид углерода (3:1), и опрыскивали пластинки 10 %-ным раствором фосфолибденовой кислоты в этаноле. Как оказалось, корень квадратный из площади пятна пропорционален логарифму содержания антиоксиданта. Рутковский и др. [97] определяли содержание пропилгаллата и ВНА также колориметрическим методом. Они разделили методом хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии ряд эфиров галловой кислоты, NDGA, ВНА и ВНТ.

Таблица 32.3

Величины  $R_f \times 100$  некоторых распространенных антиоксидантов

Антиоксидант	Полиамид			Салицилат			Силицилат, пропигианный парафиновым маслом
	$\text{CH}_3\text{OH}-(\text{CH}_2)_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}$ (6:1:3) [91]		$\text{CHCl}_3^a$ [85]	$\text{CH}_3\text{OH}^a$ [85]	$\text{CHCl}_3^a$ [85]	$\text{C}_6\text{H}_6^a$ [85]	
	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1) <sup>a</sup> [86]	$\text{CH}_3\text{OH}^a$ [85]	$\text{CHCl}_3^a$ [85]	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1) <sup>a</sup> [86]	$\text{CHCl}_3^a$ [85]	$\text{C}_6\text{H}_6^a$ [85]	
Пропилгаллат (PG)	56	61	00	61	00	00	82
Бутилксианисол (ВНА)	67	66	52	66	31	31	65
Нордигидрогваяретовая кислота (NDGA)	27	45	00	45	79	75	12
Бутилксиолуол (ВНТ)		70	89	70	00	00	50
Изоамилгаллат		61	00	61			20
Октилгаллат							
Лаурилгаллат							

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 10 см.

Таблица 32.4

Величины  $R_f \times 100$  некоторых галлатов, применяемых в качестве антиоксидантов, полученных на ацетилованной (10 %) целлюлозе и на полиамиде

Галлат	Ацетилованная целлюлоза [88]	Полиамид [89]					тетрахлорид углерода—метанол (7:3)	диэтиловый эфир
		бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5)	тетрахлорид углерода—этанол (7:3)	тетрахлорид углерода—этанол (3:2)	этанол	тетрахлорид углерода—метанол (7:3)		
Галловая кислота	3	28	5	8	31	6	4	
Метилгаллат	10	60	19	33	53	29	7	
Этилгаллат	19	70	26	44	67	39	13	
Пропилгаллат	29	68	44	47	55	46	28	
Бутилгаллат	40	89	62	73	80	63	45	
Октилгаллат	67		80	85	80	80	67	
Додецилгаллат	83							
Лаурилгаллат								

Таблица 32 5

Величины  $R_f \times 100$  некоторых фенольных антиоксидантов, полученные на незакрепленных слоях полиамида [90]<sup>a</sup>

Антиоксидант	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{CCl}_4$ (1 : 9)	$\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (6 : 4)
Фенол	67	37
4-Метилфенол	57	10
4-трет-Бутилфенол	67	59
2-трет-Октилфенол	54	25
4-трет-Октилфенол	73	35
4-Фенилфенол	46	36
2-Фенилфенол	76	37
4-Циклогексилфенол	70	33
Пирокатехин	29	73
3-Метилпирокатехин	24	70
4-Метилпирокатехин	20	69
4-трет-Бутилпирокатехин	25	53
4-трет-Октилпирокатехин	56	56
3,4-Ди-трет-бутилпирокатехин	73	63
4-трет-Октилгомипирокатехин	33	36
Резорцин	50	62
Гидрохинон	72	5
Пирогаллол	67	4
Галловая кислота	1	32
4-трет-Октилпирогаллол	43	29
4-трет-Октилоксибензохинон	46	23
Флороглюцин	54	8
Оксигидрохинон	18	95
$\alpha$ -Нафтол	38	10
$\beta$ -Нафтол	42	37

<sup>a</sup> С разрешения авторов и издателей.

#### 4. НЕПИЩЕВЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

Слонейкер и Сиверс [98], а также Хейде и Воутерс [99] идентифицировали методом ТСХ на силикагеле следовые количества антиоксидантов в полиэтилене. В качестве элюирующих

растворителей они применяли 4 %-ный раствор метанола в циклогексане или 10 %-ный раствор этилацетата в петролейном эфире. Антиоксиданты экстрагировали из 1 кг гранулированного полиэтилена 1,5 л гексана в течение 4 ч при 50°C. Далее экстракт охлаждали до 0°C, фильтровали, фильтрат упаривали на паровой бане при температуре ниже 50°C до 35 мл. При повторном охлаждении до 0°C извлекался оставшийся низкомолекулярный полиэтилен. Затем экстракт еще раз упаривали до 5 мл, переводили антиоксидант в этанольный раствор, дважды экстрагируя его этанолом порциями по 5 мл. Полученный спиртовой раствор можно непосредственно наносить на тонкослойные пластинки. Разделение антиоксидантов вели на слоях силикагеля, элюируя их 4 %-ным раствором метанола в циклогексане или 10 %-ным раствором этилацетата в петролейном эфире. В качестве обнаруживающих реактивов эти авторы применяли или 3 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле и затем выдерживали пластинку в парах аммиака, или 2 %-ный раствор 2,6-дихлорхинонхлоримида в спирте и затем через 15 мин 2 %-ный раствор буры. В табл. 32.6 приведены величины  $R_f$  нескольких таких антиоксидантов.

Таблица 32 6

Интервалы величины  $R_f \times 100$  добавляемых к полиэтилену антиоксидантов, полученные на силикагеле [99]<sup>a</sup>

Антиоксидант	Петролейный эфир—этилацетат (9 : 1)
Сантонокс R [4,4'-тиобис(6-трет-бутил-м-крезол)]	19—25
Нонокс DPPD (дифенил-п-фенилдиамин)	24—30
Неозон А или ASM-PAN (N-фенил- $\alpha$ -нафтиламин)	58—65
Аджерит или ASM-PBN (N-фенил- $\beta$ -нафтиламин)	45—50
Стабилизатор 2246 [2,2-метиленбис(4-метил-6-трет-бутилфенол)]	60—70
Ионол (2,6-ди-трет-бутил-п-крезол)	78—85
Аджерит белый (ди-N- $\beta$ -нафтил-п-фенилендиамин)	17—25 (прожилки)

<sup>a</sup> С разрешения авторов и J. F. Bergmann.

Добис [100] анализировал антиоксиданты фенольного типа, содержащиеся в полиэтиленовых и полипропиленовых пленках, на слоях силикагеля G со смесью циклогексан—метанол (15:3) и на слоях силикагеля G, пропитанного 5 % силикона, со смесью этанол—вода (3:1). Разделенные соединения

обнаруживали фосфомолибденовой кислотой и определяли их содержание *in situ* методом денситометрии. В пробе в 5 г можно определить 0,02 % антиоксиданта, тогда как с помощью метода Слонейкера и Сиверса [98] можно определить  $1 \cdot 10^{-4}$  %, но в пробах большего размера. Хейде и др. [101] определяли методом ТСХ наличие неразрешенных к утолщению антиоксидантов в пластиках, применяемых для упаковки пищевых продуктов. Майлс [102] разделял на слоях смеси силикагеля с оксидом алюминия (1:1) антиоксиданты, введенные в полиолефиновые полимеры. В качестве элюирующего растворителя он применял хлороформ. Симпсон и Керрел [103] разделили на силикагеле GF<sub>254</sub> 21 антиоксидант, используемый в пластиках. Они привели величины  $R_f$ , полученные при элюировании смесями бензол—этилацетат—ацетон (100:5:2) и хлороформ—гексан (2:1).

Тонкослойная хроматография применялась также для разделения антиоксидантов и других присадок, вводимых в смазочные масла [104—108]. Делвс [104] обнаружил, что на обработанных 2 н. раствором гидроксида натрия слоях силикагеля разделение азотсодержащих антиоксидантов лучше, чем на нейтральных слоях. Он дал величины  $R_f$  семи соединений, полученные при элюировании смесью бензол—*n*-гексан (2:3). Делвс установил, что 20 %-ным раствором (объем/объем) пентахлорида сурьмы в тетрахлориде углерода можно обнаружить 1 мкг антиоксиданта. Кокс [105] применял силикагель с флуоресцентным индикатором для разделения диалкил- и диарилдифосфатов, вводимых в качестве присадок в смазочные масла. В качестве элюирующего растворителя он выбрал смесь тетрахлорида углерода и толуола (4:1). При обработке хроматограммы реактивом Т-189 и последующем 5-минутном нагревании при 100°C на белом фоне пластинки появлялись коричневые пятна. Количественные определения Кокс проводил методом денситометрии. Коутс [106] экстрагировал метанолом антиоксиданты из смазочных масел и разделял фенольные антиоксиданты на силикагеле смесями диизопропиловый эфир—изооктан (3:97), этилацетат—изооктан (3:97), а также тетрахлоридом углерода. Азотсодержащие антиоксиданты он элюировал тетрахлоридом углерода и смесью этилацетат—изооктан указанного состава. Коутс анализировал методом ТСХ также многие другие присадки к смазочным маслам. В работе [107] описана методика определения антиоксиданта—6-*трет*-бутил-2,4-ксиленола в топливах для авиационных турбореактивных двигателей. Это соединение сначала извлекают, адсорбируя оксидом алюминия, затем элюируют с адсорбента, наносят на слой силикагеля, содержащий флуоресцирующую добавку, и хроматографируют тетрахлоридом углерода ( $R_f$  0,50). Количественное определение

проводят визуально или денситометрически. Крамп [108] выделял фенолы из керосина методом двумерной хроматографии. Сначала он обрабатывал фенолы диазотированным *n*-нитроанилином, затем наносил пробу на силикагель, предварительно обработанный 0,5 н. раствором гидроксида натрия, и элюировал в одном направлении смесью хлороформ—ацетон (9:1), а в другом направлении смесью бензол—ди-*n*-пропиламин (4:1).

В ряде работ [109—114] описано также разделение и идентификация антиоксидантов и ускорителей вулканизации каучуков. Крейнер [115] обобщил результаты работ по ТСХ ингредиентов резиновых смесей, опубликованных за период с 1958 г. до середины 1970 г.

## 5. ВЗРЫВЧАТЫЕ ВЕЩЕСТВА

Исследованию взрывчатых веществ (ВВ) и продуктов их сгорания методом ТСХ посвящен ряд работ. Хертон [116] изучал разделение гексогена и октогена, а также ряда промежуточных продуктов. Фот и Рёкер [117] дополнили методику Хертон количественным денситометрическим анализом, пригодным для контроля качества получаемых соединений. Рао и др. [118] хроматографировали иницирующие ВВ — нитроэфиры гликоля, глицерина, диэтиленгликоля и диглицеринового спирта. Ганссон и Альм [119] определяли методом ТСХ присутствие дифениламина, который применяется как стабилизатор в порохах и некоторых смесевых ВВ. Его стабилизирующее действие объясняется следующим: дифениламин реагирует с окислами азота, образуя комплекс при медленном разложении ВВ, с образованием нитро- и N-нитрозпроизводных. Эти соединения можно разделить на слоях силикагеля, предварительно активированных при 110°C. Пробы можно наносить в виде раствора в ацетоне, а в качестве элюирующих растворителей применять бензол, хлороформ или толуол. Ганссон и Альм обнаруживали производные дифениламина 0,2 %-ным раствором нитрата натрия в спирте и 1 н. серной кислотой. Ясуда [120] разделил и идентифицировал методом двумерной хроматографии 19 N-нитрози и нитродифениламинов. Тетра- и пентанитродифениламины разделить ему не удалось. Чтобы в качестве обнаруживающего реактива можно было использовать *n*-диэтиламинобензальдегид, непосредственно в слой адсорбента вводили цинковую пыль, под действием которой нитросоединение восстанавливалось. С этой целью 3 г цинковой пыли смешивали с 30 г силикагеля и 65 мл воды. После нанесения слоев их активировали 1—2 ч при 110°C. Двумерное хроматографирование вели смесями ацетон—бензол—петролейный эфир (2:99:99) и этилацетат—петролейный эфир (1:4). По полученным данным построена кривая величин



$R_f$ . Таким же методом идентифицировали продукты реакции этилцентралита (стабилизатор) с тетраоксидом азота [121] [причем в одном направлении пробу элюировали 1,2-дихлорэтаном, а в другом — смесью этилацетат—петролейный эфир (1:3)], тетрила и родственных соединений [122] и примеси в 1,3,5-триамино-2,4,6-тринитробензоле [123].

Ганссон [124] хроматографировали ряд ВВ, элюируя их бензолом, хлороформом и смесью петролейный эфир—ацетон (5:3). Пятна этих ВВ он обнаруживал опрыскиванием дифениламином с последующим УФ-облучением. В табл. 32.7 даны величины  $R_f$  некоторых ВВ.

Таблица 32.7

Величины  $R_f \times 100$  ряда взрывчатых веществ, полученные на активированном при 110 °С силикагеле [119, 124] <sup>а</sup>

Взрывчатые вещества	Бензол	Хлороформ	Петролейный эфир—ацетон (5:3)
Нитрат аммония	0	0	0
Дипикриламид	0	0	6
Пикриновая кислота	0	0	9
Октоген <sup>б</sup>	4	0	23
Гексоген <sup>в</sup>	5	10	39
ДИНА <sup>г</sup>	16	42	56
Тетрил <sup>д</sup>	26	46	62
Тринитробензол	40	62	71
ТЭН <sup>е</sup>	41	61	74
Тротил <sup>ж</sup>	48	68	73
Дифениламин	62	86	
N-Нитрозодифениламин	46	81	
4-Нитрозодифениламин	7	28	
2 Нитродифениламин	58	86	
2,4 Динитродифениламин	43	81	
2,4'-Динитродифениламин	37	77	
симм Гексанитродифениламин	5	5	
Трифениламин	75	91	

<sup>а</sup> Длина пути элюирования 10 см

<sup>б</sup> Октоген—циклотетраметилен-1,3,5,7-тетранитрамин

<sup>в</sup> Гексоген—циклотриметилен-1,3,5 тринитрамин

<sup>г</sup> ДИНА—динитроксидэтилнитрамин

<sup>д</sup> Тетрил—N-метил 2,4,6-тетранитроанилин

<sup>е</sup> ТЭН—тетранитропентаэритрит.

<sup>ж</sup> Тротил—тринитротолуол

Чендлер и др. [125] разделяли все основные продукты окисления, образующиеся на разных стадиях непрерывного нитрования толуола до ТНТ. Адсорбентом при этом служил слой силикагеля с добавкой крахмала в качестве связующего, элюирующим растворителем — смеси бензол—циклогексан—этилацетат (10:9:1) и бензол—диэтиловый эфир—этанол (5:3:2), к которым добавляли по несколько капель аммиака, чтобы предотвратить образование «хвостов», вызываемое кислотой нитрирующей смесью. Пятна обнаруживали, облучая пластинки УФ-лучами или обрабатывая их реактивом Т-114. Мидкиф и Вашингтон [126, 127] использовали ТСХ наряду с другими методами для обнаружения продуктов детонации различных ВВ. Эти авторы приводят величины  $R_f$  2,4,6-тринитротолуола, циклометилентринитрамина (гексогена) и компонентов некоторых динамитов (нитроглицерин и динитрат этиленгликоля), полученные с различными растворителями. Хофзommer и Гловер [128] проводили разложение ВВ в капилляре и полученные продукты анализировали методами ТСХ в сочетании со спектрофотометрией или ГХ, а Хофзommer [129] проводил анализ на газовом хроматографе с <sup>63</sup>Ni-электронно-захватным детектором, а затем на тонкослойной хроматографической пластинке, с тем чтобы определить количество нитросоединений при их содержании порядка пикограммов. Арчер [130] разделял и идентифицировал методом ТСХ добавки и стабилизаторы, вводимые в бездымный порох. Парихар и др. [131] нашли, что разделение динитрата диэтиленгликоля, нитроглицерина, динитрата этиленгликоля, тетранитрата пентаэритрита, гексанитрата маннита и гексанитрата сорбита на слоях оксида алюминия идет лучше, чем на слоях силикагеля. В числе использованных этим автором элюирующих растворителей были: ксилол, толуол, монохлорбензол и смесь петролейного эфира с этилендихлоридом (4:1). Парихар и др. [132, 133] разделяли и идентифицировали ВВ в виде их  $\pi$ -комплекс с аминами; таким способом удается разделить соединения, не поддающиеся разделению в неизменном виде.

## 6. МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

### Оловоорганические стабилизаторы

Оловоорганические соединения вводят как стабилизирующие добавки в поливинилхлоридные пластики. Содержание этих добавок необходимо строго контролировать, поскольку пластики широко используются как упаковочный материал для пищевых продуктов. Тюрлер и Хегль [134] хроматографировали несколько таких соединений на слоях силикагеля G, вводя в слой 0,1—0,2 г этилендиаминтетраацетата (на 30 г силикагеля), чтобы

маскировать содержащиеся в слое соли металлов. При элюировании насыщенной водой смесью *n*-бутанол—уксусная кислота (60:1) можно четко разделить производные дибутил- и трибутилолова, но при этом все соединения первой группы, а именно

Таблица 32.8

Величины  $R_f \times 100$  оловоорганических соединений, полученные на силикагеле с различными растворителями [135]<sup>а, б</sup>

Соединение	Растворитель <sup>в</sup>					
	А	Б	В	Г	Д	Е
Дихлорид диметилолова	0	0	0	0	2	0
Дихлорид диэтилолова	0	0	0	0	9	0
Хлорид триэтилолова	2	7	48	17		
Тетраэтилово	100	100	100	100		100
Ацетат трипропилолова	9	34	71	29		
Дихлорид дибутилолова	0	0	0	0	38	
Хлорид трибутилолова	21	45	85	41		83
Тетрабутилово	100	100	100	100		100
Дихлорид дигексилолова	0	0	0	0	57	
Хлорид тригексилолова	45	54	92	60		
Тетрагексилово	100	100	100	100		100
Дихлорид ди-2-этилгексилолова	0	0	0	0		
Дихлорид диоктилолова	0	0	0	0	68	
Хлорид три-2-этилгексилолова	78	69	100	82		
Тetra-2-этилгексилово	100	100	100	100		
Дихлорид дифенилолова	0	0	0	0	29	0
Ацетат трифенилолова	55	55	84	60		
Тетрафенилово	100	100	100	100		
Трихлорид бутилолова						0
Бутилтиоловая кислота	0	0	0	0		0

<sup>а</sup> С разрешения автора и Springer-Verlag.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

<sup>в</sup> Растворители: А — насыщенная водой смесь бутанол—пиридин (15:7); Б — насыщенная водой смесь бутанол—этанол (3:1); В — бутанол, насыщенный 25 %-ным раствором аммиака; Г — верхняя фаза смеси бутанол—2,5 %-ный раствор аммиака; Д — смесь (2:1) изопропанол и 1 объем 1 н. раствора ацетата натрия+1 объем 1 н. уксусной кислоты; Е — смесь (2:1) изопропанол и 2 объема 10 %-ного раствора карбоната аммония+1 объем 5 н. раствора аммиака.

дилаурат, дихлорид, диолеат и дималеат дибутилолова, характеризуются одинаковыми величинами  $R_f$ . С этой же элюирующей системой можно разделить производные дибутил- и диоктилолова. Дибензилпроизводные характеризуются теми же величинами  $R_f$ , что и производные диоктилолова. Однако соли дибутил-, диоктил- и дибензилолова можно разделить смесью вода—бутанол—этанол—уксусная кислота (10:5:5:0,15). Обнаруживают эти соединения опрыскиванием раствором 10 мг дитизона в 100 мл хлороформа. Для обнаружения солей диалкилолова пригоден также дифенилкарбазон, но он не обнаруживает производных триалкилолова.

Бюргер [135] исследовал ряд растворителей, пригодных для разделения оловоорганических соединений на слоях силикагеля. Полученные им величины  $R_f$  приведены в табл. 32.8. Пятна соединений обнаруживали, опрыскивая пластинки 0,1 %-ным спиртовым раствором пирокатехинового фиолетового, и наблюдали при облучении УФ-лампой. Нейберт [136], Хейде [137, 138], Кох и Фигге [139], Симпсон и Керрелл [103] также опубликовали работы по анализу оловоорганических стабилизаторов.

### Производные ферроцена

Шлегль и др. [140—148] получили и исследовали большое число производных ферроцена. Они использовали ТСХ на силикагеле G как для очистки многих из этих соединений, так и для определения их хроматографических характеристик. Менее полярные соединения, например ферроцен и алкилферроцены, хроматографировали гексаном, а в некоторых случаях смесями пропиленгликоль—метанол (1:1) и хлорбензол—пропиленгликоль—метанол (1:1:1). Более полярные гликоли, спирты и карбонильные соединения хроматографировали бензолом и смесями бензол—этанол (15:1 и 30:1). Величины  $R_f$  85 таких соединений даны в виде графиков [140, 145, 146]. В большинстве случаев положение пятен можно установить сразу, без дополнительной обработки хроматограммы, однако окраску слабоокрашенных соединений можно усилить, обрабатывая пластинки окислителем, например бромом или 1 %-ным раствором периодата натрия.

### Прочие металлоорганические соединения

Вобеcki и др. [149] хроматографировали на оксиде алюминия трифениларсин, трифенилстильбин, трифенилвисмутин, трифенилфосфин и ди-*o*-метилфенилтеллурид. Вобеcki и др. [150] разделяли теллуруорганические соединения на оксиде алюминия петролевым эфиром.

Джонсон и Виккерс [151] разделяли на силикагеле ртутьорганические соединения в виде хлоридов при непрерывном элюировании смесью циклогексан—ацетон (4:1). Теттон и Уэгстаф [152] хроматографировали на силикагеле и оксиде алюминия дитизонаты ртутьорганических соединений, элюируя их несколькими смесями гексан—ацетон и петролейный эфир—ацетон. Эти авторы привели величины  $R_f$  семи соединений. Такешита и др. [153] использовали хроматографию с обращенными фазами для разделения дитизонатов алкилртутных соединений. Самое лучшее разделение получено на пропитанном 20 % жидкого парафина адсорбенте Avicel SF (Avicel Sales Division, FMC) при элюировании смесью метилцеллозольв—вода (3:1). Фишбейн [154] опубликовал обзор по хроматографическим и биологическим свойствам ртутьорганических соединений.

Друдинг и Шупак [155] хроматографировали на силикагеле несколько платиновых и палладиевых комплексов, элюируя их диметилсульфоксидом, к которому добавляли по три капли химически чистого (reagent) хлороформа, чтобы предотвратить образование «хвостов». Обнаруживающим реагентом служил 5 %-ный водный раствор хлорида олова.

## 7. ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА И СЕРЫ

Клемент и Вильд [156] хроматографировали ряд соединений фосфора, в том числе третичные алкилфосфаты, трифенилфосфат, эфиры амидофосфорной, тиофосфорной и фосфористой кислот, а также аммонийные соли диалкил- и диарилфосфатов. В зависимости от того, какие соединения нужно было разделить, применяли 8 систем растворителей, представляющих собой различные смеси гексана, бензола, метанола, хлороформа, диметилформамида, этанола, уксусной кислоты и метилхлорида. Разделенные соединения обнаруживали опрыскиванием реактивом, содержащим молибдат аммония и хлорную кислоту. Эфиры тиофосфорной кислоты обнаруживали 1 %-ным раствором нитрата серебра, к которому добавляли несколько капель концентрированной серной кислоты. Доннер и Лос [157] опубликовали список величин  $R_f$  большого числа эфиров фосфорной и фосфористой кислот. Получены эти величины на силикагеле при элюировании следующими двумя растворителями: одним из растворителей Клемента и Вильда [156] — смесью гексан—бензол—метанол (2:1:1) и смесью гексан—метанол—эфир (6:1:1). В качестве более чувствительного реактива для обнаружения пятен соединений Доннер и Лос использовали 1 %-ный безводный раствор хлорида кобальта в ацетоне. При этом пятна почти всех соединений, кроме эфиров, взятых в малых концентрациях, обнаруживаются даже на холоду. При очень низкой concentra-

ции эфиров пластинки необходимо нагревать до 40—50°C. Рейтер и Ганке [158] хроматографировали этиловые эфиры фосфорной кислоты.

Шиндльбауэр и Миттерхофер [159] указали, что фосфины и сульфиды фосфинов можно разделять на слоях силикагеля при элюировании слабо и умеренно полярными растворителями; величины  $R_f$  при этом возрастают в следующем порядке: третичные фосфины > вторичные фосфины > первичные фосфины. Изомеры положения, например три тритолилфосфина, лучше всего разделять на основном оксиде алюминия при элюировании смесью гексан—бензол (5:1). Фосфиноксиды хорошо разделяются при элюировании смесями эфира с этилацетатом. Фосфины можно окислить до фосфиноксидов непосредственно в слое, нанося на него до начала элюирования раствор иода в тетраглюкоре углерода.

Ламотт и др. [160—163] исследовали разделение соединений фосфора методом ТСХ. Простые фосфаты они хроматографировали на силикагеле смесью трет-бутанол—ацетон—вода—аммиак (5:4:1:1). Нейтральные фосфорорганические соединения также хорошо разделяются на силикагеле при элюировании смесями гексан—ацетон или гексан—метилизобутилкетон (3:1). Для разделения авторы работ [160—163] использовали также другие растворители: смеси ацетон—вода—метанол (75:25:10) с добавкой 100 мг трихлоруксусной кислоты, трет-бутанол—ацетонитрил—аммиак (5:4:1) и ацетон—трет-бутанол—вода—аммиак (5:4:1:1). Фосфаты разделяли смесью гексан—ацетон—этилацетат (3:1:1), фосфонаты — смесью тех же компонентов, но в соотношении 8:3:9, а фосфинаты — смесью трет-бутанол—гексан (1:3) [162]. Все эти соединения фосфора можно обнаружить с помощью реактива, содержащего молибдат аммония и хлорную кислоту (реактив Т-15). Разделение фосфорорганических соединений методом ТСХ рассматривается также в работах Блоома [164], Иванова и др. [165], Печика и Штегера [166], де Ликастро и Руведа [167] и Нойберта [168].

Мастрюкова и др. [169] хроматографировали на тонких слоях оксида алюминия и содержащего 6 % воды силикагеля эфиры и амиды тиофосфорных кислот и их пиррофосфорные аналоги, элюируя их смесями гексан—ацетон (10:1 и 4:1). Обработывая хроматограммы перманганатом калия или парами иода, они обнаружили 24 соединения. Печик и Штегер [170] разделяли на закрепленных крахмалом тонких слоях оксида алюминия алифатические эфиры тиофосфорной кислоты, элюируя их смесью *n*-гептан—ацетон (10:1). Обнаруживающий реактив представлял собой 10 %-ный раствор параиодной кислоты в 70 %-ной хлорной кислоте, содержащий на 100 мл несколько миллиграммов пентоксида ванадия. Установлено, что этот

реагент более чувствителен при обнаружении органических и неорганических серу- и селенсодержащих соединений, чем реагент на основе иода и азиды натрия [171]. Эртель и Хорнер [172] хроматографировали на силикагеле в нескольких растворителях некоторые фосфиноксиды вместе с фенилбензилсульфидом и продуктами его окисления. Для обнаружения пятен этих соединений они применяли реактивы на основе бихромата и серной кислоты или перманганата и серной кислоты. (Не забывают, что последний реагент нельзя готовить сразу в больших количествах, потому что пентоксид магния взрывчат.) Стефан и Эрдмен [173] рекомендуют следующую методику обнаружения соединений двухвалентной серы, например *dl*-метионина, алифатических и ароматических тиолов, сульфидов и тиокетонов. Сначала пластинку опрыскивают 0,1 %-ным раствором метаиодата натрия, а через 4 мин — 0,5 %-ным раствором бензидина в смеси бутанол—уксусная кислота (4:1). При использовании этой методики получаются белые пятна на темно-синем фоне окисленного бензидина. Чувствительность обнаружения этим методом метионина — от 5 до 10 мкг, ароматических серосодержащих соединений — 20—30 мкг.

Кертис и Филлипс [174] хроматографировали на силикагеле G и оксиде алюминия G 26 производных тиофена. Неполарные тиофены они разделяли на оксиде алюминия, элюируя петролейным эфиром (40—60°C), а умеренно полярные тиофены — на силикагеле, элюируя смесью бензол—хлороформ (9:1). Сильнополярные тиофены, в частности содержащие карбоксильные группы, разделяли на силикагеле, применяя для элюирования метанол. Пятна соединений обнаруживали при УФ-облучении или при опрыскивании 0,4 %-ным раствором изатина в серной кислоте. В результате обработки последним реагентом пятна окрашиваются уже при комнатной температуре, иногда пластинки нагреваются до 120°C. Майер и др. [175] хроматографировали на слоях силикагеля G 53 тритиона и 16 соединений типа 1,2-тиазолин-5-тиона. Неполарные тритионы элюировали смесью петролейный эфир—бензол (1:1) или сероуглеродом. Более полярные тритионы и тиазолинтионы элюировали смесью бензол—этилацетат (3:1); сильнополярные соединения, содержащие карбоксильные или гидроксильные группы, — чистым ацетоном. Для подтверждения правильности идентификации этих соединений ТСХ сочетали с абсорбционной спектроскопией. Пятна соединений на хроматографических пластинках обнаруживали тетрацианэтиленом.

Фишбейн и Фоукс [176] разделяли на силикагеле DF-5 сульфиды, сульфоны и сульфоксиды, элюируя пробы смесью толуол—этилацетат (1:1) и 2,5 %-ным раствором ацетона в бензоле. Эти авторы испытали пять обнаруживающих реактивов; луч-

шими из них оказались реактивы Т-252 и Т-80. Соединения этой группы можно разделять также на оксиде алюминия [177—182]. Караулова и др. [177] применяли незакрепленные слои оксида алюминия и смесь ацетон—тетрахлорид углерода (1:4) в качестве растворителя для разделения гетеро- и алициклических диалкил-, алкиларил- и диарилсульфоксидов. Чувствительность обнаружения парами иода составляла 3,5—10 мкг. Снеготский и Снеготская [178] разделяли на оксиде алюминия (активность II, без связующего) при элюировании гексаном тиолы, сульфиды и дисульфиды. Сульфоксиды и сульфоны они хроматографировали диэтиловым эфиром. 2-(Алкилтио)этанола хроматографировали смесью гексан—эфир (1:2), а их сульфоксиды и сульфоны — смесью гексан—ацетон (1:1). Хлорсульфоланы разделяли эфиром, а алкилвинилсульфоны — смесью гексан—эфир (1:3). Применяя в качестве адсорбента незакрепленные слои оксида алюминия (активность III или IV), Новицкая и др. [179] определили  $R_f$  некоторых органических сульфидов, сульфоксидов и сульфонов при элюировании 7 растворителями. Принцлер и др. [180] использовали смесь 96 %-ная уксусная кислота—ацетонитрил (1:3) для элюирования алкилсульфидов и смесь метанол—хлороформ—вода (5:15:1) для элюирования арилсульфидов. Эти авторы разделяли сульфоксиды [181], меркаптаны и тиофенолы [182] на пропитанных слоях двумерным хроматографированием. Хили и Камерон [183] разделяли полисульфиды на силикагеле сероуглеродом.

Методом ТСХ на силикагеле выделяли и очищали тиосахара, элюируя их смесью этилацетат—ацетон (4:1) [184].

## 8. ПЕРОКСИДЫ, ЭПОКСИСОЕДИНЕНИЯ И ОЗОНИДЫ

Тонкослойная хроматография применяется в химии липидов для разделения жирных эпоксикислот [185—187]; этим методом разделяют различные продукты окисления липидов [188—191].

В таких случаях адсорбентом может служить кремневая кислота, а элюирующим растворителем — гексан или петролейный эфир с добавкой от 3 до 10 % диэтилового эфира, причем концентрация этой добавки зависит от характера анализируемых соединений. Обнаруживают соединения этой группы опрыскиванием 50 %-ной серной кислотой с последующим 15-минутным нагреванием при 105—110°C. В табл. 32.9 приведены величины  $R_f$  некоторых эпоксикислот. Кауфман и Макус [185] разделили несколько эпоксикислот на силикагеле G, пропитанном 15 %-ным раствором ундекана в петролейном эфире. Обнаруживающим реактивом в этом случае служила 96 %-ная уксусная кислота. Приветт и Никель [192], а также Приветт и Бланк [193] хроматографировали озониды различных липидов. В качестве

Таблица 32.9

Величины  $R_f \times 100$  некоторых эпоксипроизводных жирных эфиров, кислот и спиртов, полученные на силикагеле

Соединение	30 % эфира в петролейном эфире (40–60° С) <sup>a</sup> [191]	10 % эфира в петролейном эфире (40–60° С) + 1 % уксусной кислоты <sup>a, б</sup> [191]	30 % эфира в петролейном эфире (40–60° С) + 1 % уксусной кислоты <sup>a, б</sup> [191]	5 % эфира в петролейном эфире (35–45° С) [187]
Метил-цис-9,10-эпокси-стеарат	86			
цис-9,10-Эпоксистеариловый спирт	32			
цис-9,10-Эпоксистеариновая кислота			61	
цис-13,14-Эпоксидокозановая кислота		56	69	
транс-13,14-Эпоксидокозановая кислота			79	
Метил-9,10-эпокси-стеарат				43
Метил-12,13-эпоксиолеат				51

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 15 см.

<sup>б</sup> Уксусная кислота добавлена для предотвращения образования прожлоков.

адсорбента они выбрали силикагель G, в качестве элюирующего растворителя — смесь диэтилового и петролейного эфиров, в которой содержание диэтилового эфира менялось от 0,6 до 25 %. Озониды можно разделить на классы по числу озонидных групп в молекуле. Этим методом можно разделить озониды триглицеридов, различающиеся только на одну озонидную группу, а также цис- и транс-озониды [194].

Если проводятся препаративные работы или количественный анализ, хроматографические силикагелевые пластинки необходимо предварительно тщательно промыть диэтиловым эфиром, чтобы удалить органические примеси. Количественное определение этих соединений проводится с помощью смеси хромовой и серной кислоты с последующим 20-минутным нагреванием при 180°С, в ходе которого органические вещества в зонах обугливаются для последующей денситометрии [195].

Нейвальд и Феттинг [189] разделяли пероксиды холестерина элюированием хлороформом на силикагеле. После опрыс-

кивания элюированных пластинок сначала смесью 5 мл 5 %-ного раствора иодида калия и 20 мл уксусной кислоты, а затем через 5 мин раствором крахмала на пластинке появлялись синие пятна пероксидов ( $R_f < 0,32$ ). Сам холестерин давал красное пятно с  $R_f 0,32$  при обработке 50 %-ным раствором трихлорида

Таблица 32.10

Величины  $R_f \times 100$  различных органических пероксидов, полученные на силикагеле G [196] <sup>a</sup>

Пероксид	Толуол—тетрахлорид углерода (2 : 1)	Толуол—уксусная кислота (19 : 1)	Петролейный эфир (50–70° С)—этилацетат (49 : 1)
Пероксид лауроила	85	95	
Пероксид 2,4-дихлорбензоила	81	88	
Пероксид 4-хлорбензоила	74	94	
Пероксид бензоила	55	70	
Пероктоат трет-бутила	28	55	
Пероксид метилизобутилкетона			
компонент А	25	55	
компонент В	00	12	
Пербензоат трет-бутила	24	47	
Пероксид циклогексанона			
компонент А	21	38	
компонент В	00	12	
компонент С	00	10	
Пероксид метилэтилкетона			
компонент А	16	42	
компонент В	10	10	
Перацетат трет-бутила	12	32	18
Гидропероксид кумола	11	33	9
2,2-Бис(трет-бутилперокси)бутан	10	35	
Гидропероксид трет-бутила	5	30	
Пероксид ди-трет-бутила	00	39	
Пероксид водорода	00	00	00

<sup>a</sup> С разрешения автора и Springer-Verlag.

сурьмы в уксусной кислоте с последующим 10-минутным нагреванием при 100°C.

Кнаппе и Петери [196] разделили на силикагеле 14 органических пероксидов (табл. 32.10). Смеси пероксидов кетонов содержали более одного компонента. Для обнаружения пятен хроматограммы опрыскивали реактивом Т-94 или свежеприготовленным реактивом Т-127.

Кавчич и Плесничар [197] сравнили эффективность разделения моно-и дизамещенных пероксибензойных кислот на 7 адсорбентах на основе полиамида и целлюлозы; элюирующим растворителем служили смеси тетрахлорид углерода—уксусная кислота (10:1) и хлорбензол—уксусная кислота (10:1). Силикагель G вызывал частичное или полное разложение этих соединений.

Сорокина и др. [198] хроматографировали 32 органических пероксида на оксиде алюминия смесями гексан—эфир (3:2), ацетон—толуол—гептан (1:1:2), ацетон—тетрахлорид углерода (1:2), а также тетрахлоридом углерода. Бузланова и др. [199] добились хорошего разделения диалкильных и диацильных пероксидов смесью гептан—диэтиловый эфир (15:1) и гидропероксидов смесью толуол—метанол (20:3) как на оксиде алюминия, так и на силикагеле. Некоторые пероксиды частично разлагались на оксиде алюминия.

Относительно разделения пероксидов терпенов см. гл. XXX, разд. 6.

## 9. ГОРМОНЫ РАСТЕНИЙ

### Гиббереллины

По данным Мандава [200], к 1973 г. было охарактеризовано 38 гиббереллинов. Ряд авторов исследовал их разделение на тонкослойных пластинках. Кутачек и др. [201] проводили хроматографию на незакрепленных слоях оксида алюминия, непрерывно элюируя смесью бензол (очищенный от тиофена)—уксусная кислота (100:23). После прохождения 60 мл этого растворителя (примерно за 6 ч) можно было отделить гиббереллин A<sub>1</sub> от гиббереллина A<sub>3</sub>. На силикагеле или кизельгуре разделение шло значительно лучше и быстрее. Сембднер и др. [202] проводили разделение на слоях силикагеля, элюируя смесью хлороформ—этилацетат—уксусная кислота в разных соотношениях, а также смесью *n*-бутанол (или *n*-пропанол)—3 *n*. раствор аммиака. Макмиллан и Зутер [203] хроматографировали на слоях как силикагеля, так и кизельгура с помощью различных растворителей (табл. 32.11). Для хроматографирования смесью бензол—пропионовая кислота—вода при длине пути 15 см требовалось 70 мин, тогда как элюирование смесью диизопропило-

Таблица 32.11

Величины  $R_f \times 100$  гиббереллинов, полученные в различных хроматографических системах<sup>а, б</sup>

Гиббереллин	Силикагель [204, 205]			Кизельгур [204, 205]			Силикагель [203]		Кизельгур [203]	
	А	Б	В	Г	В	Д	Е	Ж	З	Ж
A <sub>1</sub>	20	49	0	0	28	49	11	0	54	26
A <sub>2</sub>	17	40	0	0	23	37	4	0	64	30
A <sub>3</sub>	19	54	0	0	18	40	11	0	42	18
A <sub>4</sub>	63	95	67	67	90	100	37	82	100	100
A <sub>5</sub>	53	87	27	45	85	90	31	35	100	88
A <sub>6</sub>	59	87	11	33	86	84	25	21	95	76
A <sub>7</sub>	60	90	57	45	85	91	37	70	100	100
A <sub>8</sub>	4	30	0	0	6	10	4	0	28	6
A <sub>9</sub>	87	95	100	100	100	100	75	100	100	100

<sup>а</sup> Длина пути элюирования 15 см.

<sup>б</sup> Растворители: А — смесь бензол—*n*-бутанол—уксусная кислота (16:3:1); В — смесь бензол—*n*-бутанол—уксусная кислота (14:5:1); В — смесь тетрахлорид углерода—уксусная кислота—вода (8:3:5), нижняя фаза; Г — нижняя фаза В+10% этилацетата; Д — нижняя фаза В+20% этилацетата; Е — смесь диизопропиловый эфир—уксусная кислота (95:5); Ж — смесь бензол—уксусная кислота—вода (8:3:5), верхняя фаза (см. текст); З — смесь бензол—пропионовая кислота—вода (8:3:5), верхняя фаза (см. текст).

вый эфир—уксусная кислота занимало всего 25 мин. При использовании системы растворителей бензол—кислота пластинки выдерживали в течение ночи в камере с нижней фазой смеси, а затем элюировали верхней фазой. Проводилось также разделение метиловых эфиров гиббереллинов (за исключением A<sub>4</sub> и A<sub>7</sub>), которые можно было разрешить на силикагеле G в двух системах растворителей (табл. 32.12). Икекава и др. [204] и Кагава и др. [205] разделяли гиббереллины с помощью пяти растворителей на слоях силикагеля или кизельгура (табл. 32.11). Если смесь растворителей содержала тетрахлорид углерода, авторы выдерживали пластинки в течение ночи в камере с верхней фазой смеси, а затем элюировали их нижней фазой или при необходимости нижней фазой с добавкой этилацетата. Наряду с разделением метиловых эфиров гиббереллинов на тонкослойных пластинках, авторы работы [204, 205] проводили и их газовую хроматографию. Для разделения всех гиббереллинов

Таблица 32.12

Величины  $R_f \times 100$  метиловых эфиров гиббереллинов, полученные на силикагеле с различными растворителями <sup>a</sup>

Растворитель	Метиловые эфиры гиббереллинов									Литература
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	
Бензол—уксусная кислота—вода (8:3:5), верхняя фаза (см текст)	33	44	26	100	100	100	100	10	100	203
Диизопропиловый эфир—уксусная кислота (98:2)	18	8	16	50	38	31	48	8	80	203
Диэтиловый эфир—бензол (4:1)	31	23	35	73	60	66	71	17	98	204
Диэтиловый эфир—петролейный эфир (4:1)	29	13	32	75	69	67	72	12	96	204

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 15 см

следует использовать не менее двух хроматографических систем из числа приведенных в табл. 32.11; можно разделить и все метиловые эфиры гиббереллинов, за исключением эфиров A<sub>4</sub> и A<sub>7</sub> (табл. 32.11). Пятна этих соединений обнаруживают опрыскиванием смесью вода—концентрированная серная кислота (3:7). Данный метод имеет очень высокую чувствительность: от 0,00025 мкг для гиббереллина A<sub>3</sub> до 0,01 мкг для гиббереллина A<sub>6</sub> [203]. После опрыскивания пластинок реагентом их надо нагреть 10 мин при 120°C и затем рассмотреть в ультрафиолетовом свете. Для обнаружения можно использовать также раствор трихлорида сурьмы в хлороформе, но этот способ менее чувствителен, чем опрыскивание раствором серной кислоты.

Кевелл и др. [206] разделили методом тонкослойной хроматографии 17 гиббереллинов, используя в качестве растворителя смесь этилацетат—хлороформ—уксусная кислота, а в качестве адсорбента—силикагель. Масгрейв [207] разделял смесь гиббереллинов A<sub>1</sub>—A<sub>9</sub> и гиббереллин A<sub>13</sub> системой растворителей бензол—уксусная кислота—пропионовая кислота—вода (8:2:1:5) на двойной полоске из кизельгура G (5,5 см) и силикагеля G (10,5 см). Пластинку с нанесенными пробами выдерживали в течение ночи в «необлицованной» камере в парах нижней фазы, а затем хроматографировали верхней фазой смеси.

### Индолилуксусная кислота и другие гормоны

Шталь и Кальдевей [208], а также Баллин [209] хроматографировали на слоях силикагеля ауксин (индолилуксусную кислоту) и другие родственные соединения (см. табл. 16.9). Для количественного определения ауксинов, выделенных посредством тонкослойной хроматографии, Кальдевей и Шталь [210] использовали модификацию известной биологической пробы с *Avena*.

Кальдевей [211] проводил также биологический анализ веществ, выделенных тонкослойной хроматографией из стеблей цветов *Fritillaria meleagris*. Стебли этих цветов содержали только индолилуксусную кислоту, два или три ее предшественника и два или три ингибитора. Дюбуше и Пиле [212] обнаружили синергическое действие силикагеля на стимулирование роста *Triticum coleoptiles* индолилуксусной кислотой, а Колле [213] в подтверждение этому нашел, что подобным образом действует и сульфат кальция.

Рейлтон [214] использовал тонкослойную хроматографию на полиамиде для очистки экстрактов тканей растений. При элюировании смесью метилэтилкетон—метанол (99:1) индолил-3-уксусная кислота продвигалась вместе с фронтом растворителя, а флуоресцирующие фенольные соединения были обнаружены в зоне с  $R_f$  0—0,6. Следы пигментов и фенольных соединений, мигрировавших вместе с фронтом растворителя, извлекались дополнительным хроматографированием в противоположном направлении смесью бензол—гексан (1:1). Важно удалить эти фенольные соединения до проведения биологического анализа. Рай и Хутцингер [215] хроматографировали восемь индольных кислот на слоях целлюлозы пятью растворителями; одним из лучших растворителей оказалась смесь бензол—уксусная кислота—вода (8:3:5).

### 10. ПЛАСТИФИКАТОРЫ

В состав большинства пластиков, выпускаемых промышленностью в настоящее время, входят пластификаторы. Но не все пластификаторы можно вводить в материалы для упаковки пищевых продуктов из-за их токсичности. Поэтому необходим метод, позволяющий обнаруживать непригодные пластификаторы. Удовлетворительные результаты дает разделение пластификаторов на силикагеле. Песеребоом [216] вводил в него 0,005 % флуоресцентного индикатора «ультрафора», поскольку в УФ-свете все исследованные им пластификаторы или флуоресцировали или обнаруживались в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне. С помощью трех растворителей (табл. 32.13) ему удалось разделить все исследованные соединения, за исключением следующих трех критических пар: трикрезилфос-

Таблица 32.13

Величины  $R_f \times 100$  и  $R_{st} \times 100$  пластификаторов, полученные на силикагеле G

Пластификатор	$R_f^a$ [218]	$R_f^a$ [217]	$R_{st}^b$ [216]		
	метилен-хлорид	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	этилацетат—изооктан (1 : 9)	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	диэтиловый эфир—гексан (4 : 1)
Эфиры лимонной кислоты					
ацетилтрибутилцитрат	32	62	53	85	70
ацетилтриэтилцитрат	19	29	26	51	29
ацетилтри-2-этилгексилцитрат	52	90 96			
трибутилцитрат	20	35			
триэтилцитрат	15	17			
Эфиры адипиновой кислоты					
бензилоктиладипинат	50				
динониладипинат	50				
диоктиладипинат	49				
диизобутиладипинат			83	86	85
2-этилгексилладипинат	50				
полиэфирполиадипинат	0				
Эфиры фосфорной кислоты					
дифенилкрезилфосфат	43				
дифенилоктилфосфат	38				
2-этилгексилдифенилфосфат			46	77	58
трихлорэтилфосфат	13				
трикрезилфосфат	49		42	86	69

Продолжение табл. 32.13

Пластификатор	$R_f^a$ [218]	$R_f^a$ [217]	$R_{st}^b$ [216]		
	метилен-хлорид	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	этилацетат—изооктан (1 : 9)	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	диэтиловый эфир—гексан (4 : 1)
триоктилфосфат	24				
трифенилфосфат	42		33	80	50
Эфиры фталевой кислоты					
бензилбутилфталат	53				
дибутилфталат	52		74	103	84
дициклогексилфталат	53	73			
дидецилфталат	63				
диэтилфталат		58	51	79	60
ди-(2-этилгексил)-фталат	58	89	114	116	115
дигексилфталат	57				
диизобутилфталат		74			
диизодецилфталат	57				
диизононилфталат	56				
диметоксиэтилфталат	10	19			
диметилфталат	38	48			
диметилциклогексилфталат	48				
динонилфталат	60		101	118	114
диоктилфталат	59	88			
Эфиры себациновой кислоты					
дибутилсебацинат	35		100	100	100
диоктилсебацинат	47				
этилгексилсебацинат	47				
полиэфир себациновой кислоты	0				



Пластификатор	$R_f^a$ [218]	$R_f^a$ [217]	$R_{st}^b$ [216]		
	метилен-хлорид	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	этилацетат—изооктан (1 : 9)	этилацетат—бензол; для фталатов (5 : 95), для цитратов (1 : 19)	диэтиловый эфир—гексан (4 : 1)
Прочие пластификаторы					
метилацеторицинолеат	33				
бутилацетилрицинолеат	40				
N-бутилбензолсульфонамид	38				
бутилфталилбутилгликолят			43	90	65
бутилстеарат			161	123	128
ди-2-этилгексилтиобутират	52				
этилфталилэтилгликолят			22	66	30
2-этил- <i>n</i> -оксибензоат	16				
триацетин	18		18	34	17

<sup>a</sup> Длина пути элюирования 10 см.

<sup>b</sup>  $R_{st}$  — величина  $R_f$ , отнесенная к дибутилсебацинату. Эти величины получены на силикагеле, содержащем 0,005 % флуоресцентного индикатора ультрафор (Badische Anilin und Soda Fabrik).

фат—бутилфталилбутилгликолят, трикрезилфосфат—2-этилгексилдифенилфосфат и 2-этилгексилдифенилфосфат—ацетилтрибутилцитрат. Однако вещества, входящие в эти пары, можно различить с помощью одного или нескольких из указанных этим автором девяти цветных реагентов. Парафлекс G2 (эпоксидированные природные глицериды), для которого значения  $R_f$  в табл. 32.13 не указаны, давал многочисленные пятна во всех трех растворителях.

Жамине [217] разделял применяемые как пластификаторы эфиры лимонной и фталевой кислот следующим методом. Разделение цитратов проводят на силикагеле G при элюировании 5 %-ным раствором этилацетата в бензоле. Эфиры фталевой кислоты разделяют с помощью трех систем растворителей: петролейный эфир (40—60°C)—этилацетат (9 : 1), изооктан—этилацетат (9 : 1) и бензол—этилацетат (19 : 1). Ацетилованные ци-

траты обнаруживают опрыскиванием 2 н. спиртовым раствором гидроксида калия с последующим нагреванием до 80°C. Неацетилованные цитраты сначала ацетируют непосредственно на пластинке, опрыскивая ее смесью 5 мл уксусного ангидрида, 0,5 мл концентрированной фосфорной кислоты и 5 мл диоксиана. Ацетилирование проводят при нагревании в течение 30 мин при 100°C. После этого опрыскивают пятна раствором гидроксида калия. Эфиры фталевой кислоты обнаруживают опрыскиванием пластинок смесью 4 н. серная кислота—20 %-ный раствор резорцина в спирте (1 : 1) с последующим выдерживанием в сушильном шкафу при 120°C в течение 10 мин. Появившиеся коричневые пятна переводят в оранжевые обработкой парами аммиака.

Браун [218] хроматографировал большое число пластификаторов, используя в качестве растворителя метиленхлорид (табл. 32.13).

Пробы пластификаторов можно наносить на тонкие слои из растворов в эфире или бензоле. Браун экстрагировал пластификаторы метиленхлоридом из тонких пленок пластиков, а Жамине вымачивал 1 г пластика в 25 мл эфира в течение 10—15 ч.

Блум [219] обнаруживал фталевые эфиры с помощью тонкослойной и газовой хроматографии. Он хроматографировал 27 соединений на силикагеле F смесью изооктан—изоамилацетат (85 : 15), указав для некоторых из них значения  $R_f$ , полученные в 10 других растворителях. Грөбель [220] хроматографировал пластификаторы и стабилизаторы, содержащиеся в поливинилиденхлоридных пленках для упаковки пищевых продуктов. Алифатические пластификаторы (трибутилцитратацетат и дибутилсебацинат) разделялись на силикагеле дихлорметаном. Хаазе [221], используя один и тот же растворитель, привел величины  $R_f$  для 30 пластификаторов. Крейнер [222] хроматографировал 14 пластификаторов и стабилизаторов для эпоксидных материалов. Значения  $R_f$  были получены им на силикагеле для следующих смесей растворителей: 1,1,1-трихлорэтан—дихлорметан (3 : 1) и 1,1,1-трихлорэтан—дихлорметан—метилэтилкетон (75 : 25 : 2). Из этих растворителей только 1,1,1-трихлорэтан был ингибирован 1,4-диоксаном.

Браун и Джинен [223] методом тонкослойной хроматографии идентифицировали кислоты, присутствующие в пластификаторах в виде примесей к сложным эфирам (относительно исследования двухосновных кислот в этой работе см. т. 1, гл. XIII, разд. 4). Кроме того, при хроматографировании на силикагеле G смесью 96 %-ный этанол—вода—25 %-ный гидроксид аммония (100 : 12 : 16) были получены следующие величины  $R_f$ : для фталевой кислоты 0,26, терефталевой кислоты 0,73, бензойной кислоты 0,76, *n*-толуиловой кислоты 0,76 и фосфорной кислоты 0,0.

## 11. ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Обруба [224] методом тонкослойной хроматографии на силикагеле определял свободные полиэтиленгликоли в неионных аддуктах оксида этилена. Он использовал три системы растворителей: этанол—метанол—гидроксид аммония (12:3:2 и 12:4:2) и этанол—метанол—вода (12:4:2). Пятна опрыскивали реактивом Драгендорфа, а этиленгликоль обнаруживали путем опрыскивания раствором нитрата серебра. Для разделения поверхностно-активных сложных эфиров и сложных эфиров полиэтиленгликоля Тома и др. [225] комбинировали методы двумерного и непрерывного хроматографирования. После нисходящей хроматографии в первом направлении смесью *n*-бутанол—этанол—25 %-ный аммиак проводили непрерывное хроматографирование в VN-камере (системы Desaga) во втором направлении. Элюирующим растворителем во втором направлении служила насыщенная метилэтилкетонем вода или смесь хлороформ—метанол—вода (3:25:12). В качестве примерной характеристики разделения этим методом можно указать на то, что пробу стеарата полиэтиленгликоля-900 удалось разделить на 17 отдельных пятен при элюировании во втором направлении смесью, содержащей *n*-бутанол. При разделении смесей различных стеаратов полиэтиленгликоля с хлороформом как растворителем для второго направления были получены стеараты полиэтиленгликоля с обозначениями 400, 900, 2000 и 4700. Опыты проводили на слоях силикагеля при длине пути 15 см для нисходящей хроматографии и при продолжительности элюирования 3 ч для непрерывного разделения. Для обнаружения соединений применяли видоизмененный реактив Драгендорфа, а также 0,005 н. раствор иода. В последнем случае при более высоких концентрациях производных полиэтиленгликоля после второго опрыскивания 0,2 %-ным раствором крахмала пятна имели окраску от фиолетовой до коричневой. Свободные жирные кислоты обнаруживали при опрыскивании сначала 0,2 %-ным раствором родамина В в этаноле, а затем 10 н. раствором гидроксида калия в 50 %-ном метаноле. Кислоты обнаруживались в виде темно-красных пятен, флуоресцировавших при УФ-облучении с длиной волны 366 нм желтым цветом [226].

Зеер [227] также анализировал неионные поверхностно-активные вещества методом хроматографии на тонких слоях силикагеля. При хроматографировании элюирующей смесью этилацетат—изопропанол—вода (65:22,7:12,3) в камере с насыщенной атмосферой ему удалось отделить различные полиглицериды друг от друга и от глицерина. Для обнаружения разделенных соединений Зеер опрыскивал хроматограммы реактивом Т-242.

Вторым обнаруживающим реактивом был аммиачный раствор нитрата серебра, дававший коричневые крапинки на ярком фоне после прокаливания пластинок при 100°C в течение 10—20 мин. Эта методика позволяла обнаружить 1 % диглицерина в смеси с 99 % глицерина. Зеер и Янссен [228] анализировали на силикагеле G пробы товарной смеси моноэфиров глицерина и диацетоксиантарной кислоты, элюируя их смесью петролейный эфир (50—70°C)—диэтиловый эфир—уксусная кислота (60:40:1) и опрыскивая фосфомолибденовой кислотой. Кениг [229] выделял неионные детергенты из 16 товарных продуктов, состоявших из эфиров жирных кислот и многоатомных спиртов, алканол-амидов жирных кислот, а также аддуктов оксида этилена. Он проводил хроматографирование на целлюлозе смесью гептан—уксусная кислота—бутанол (65:20:15), на оксиде алюминия смесью этилацетат—пиридин (2:3) и на силикагеле смесью хлороформ—метанол (9:1 или 4:1). Стенчер и др. [230] при анализе неионных поверхностно-активных реагентов на основе полиоксиэтилена комбинировали тонкослойную и газовую хроматографию.

Менголд и Каммерек [231] обсуждали результаты разделения некоторых изготовленных из алифатических липидов поверхностно-активных веществ на слоях силикагеля, содержавших 10 % сульфата аммония. Смеси N-ацилированного саркозина, сложного эфира оленовой кислоты с оксисульфоновой кислотой и N-ацилированных короткоцепочечных аминокислот элюировали растворителем, содержащим 3 % подкисленного метанола (к метанолу добавляли 5 % 0,1 н. серной кислоты) в хлороформе. Алкилсульфаты, алкилсульфонаты, алкилфосфаты и алкилфосфонаты разделяли на слоях того же адсорбента, элюируя 20 %-ным раствором подкисленного метанола в хлороформе. Гофман [232] разделял некоторые анионные детергенты, например олеилтаурат натрия, лаурилсульфат натрия и т. д., смесью изоамилацетат—пропионовая кислота—*n*-пропанол—вода (4:3:2:1). Алкилсульфаты можно также отделить на оксипатите от алкилсульфонатов смесью *n*-бутиловый эфир—метанол—уксусная кислота (5:5:1). Такаги и Фукузumi [233] также разделяли синтетические поверхностно-активные вещества на пластинках с силикагелем.

Десмонд и Борден [234] хроматографировали ряд поверхностно-активных веществ на тонких слоях оксида алюминия с изопропанолом в качестве элюирующего растворителя. Им удалось разделить алкиларилсульфонаты, мыла, ксилосульфонаты, толуолсульфонаты, сульфированные этоксилаты спиртов, сульфированные алкилфенолэтоксилаты, оксиды аминов, алканол-амиды и этоксилаты. Для обнаружения пятен эти авторы опрыскивали хроматограммы 0,05 %-ным раствором пинакриптола

желтого в этаноле. При УФ-облучении они обнаружили многочисленные окрашенные пятна разделенных веществ, за исключением нефлуоресцировавших алканоламидов. Алканоламиды обнаруживали посредством обработки парами иода. Аллен и Мартин [235] разделяли сульфаты алкенов и оксиды алканов на пропитанном раствором сульфата аммония силикагеле, элюируя смесью хлороформ—метанол—0,1 н. серная кислота (35:16:3). Разделенные вещества обнаруживали путем обугливания под действием триоксида серы и затем количественно определяли методом денситометрии. Гордынська и Легатова [236] определяли остаточные количества анионных и катионных детергентов методом разделения на силикагеле смесью этилацетат—метанол—аммиак (12:3:1). Такешита и др. [237] хроматографировали на закрепленном целлюлозой полиамиде 16 алкансульфонатов натрия и 8 алкилбензолсульфонатов натрия. Элюирующим растворителем служила смесь раствор аммиака (0—1 н.)—пиридин (15:1), а также смесь 0,1 н. аммиак—пиридин—метанол (от 15:1:0 до 15:1:15, т. е. растворы аммиака разной нормальности и разные концентрации метанола).

Гровс и Мустафа [238] отмечали, что смеси поверхностно-активных реагентов иногда вступают во взаимодействие, в результате чего на хроматограммах появляются дополнительные пятна.

## 12. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЗАМЕНИТЕЛИ САХАРА

Вальди [239] хроматографировал сахарин и дульцин на слоях силикагеля G, элюируя смесью хлороформ—уксусная кислота (9:1). Предварительно из подкисленного водного раствора экстрагировали этилацетатом сахарин. Дульцин также экстрагировали этилацетатом, но после подщелачивания раствора. Эти соединения обнаруживали на хроматограммах при опрыскивании сначала 0,5 %-ным этанольным раствором роданина B, а затем аммиачным раствором нитрата серебра. Сало и др. [240, 241] хроматографировали сахарин, дульцин и цикламат на адсорбционных слоях из смеси 60 % ацетилцеллюлозы (порошок целлюлозы MN300Ac) и 40 % полиамида (Woelm). Сахарин и дульцин наносили на пластинку из 0,1 %-ного метанольного раствора, а цикламат из 0,1 %-ного раствора в смеси вода—метанол (1:1). После элюирования смесью Shell Sol A—*n*-пропанол—уксусная кислота—муравьиная кислота (45:6:7:2) были получены следующие величины  $R_f$ : сахарин 0,47, дульцин 0,66, цикламат 0,28. Разделенные соединения обнаруживали после опрыскивания 0,2 %-ным этанольным раствором дихлорфлуоресцеина при УФ-облучении с длиной волны 254 нм.

Корбелак и Бартлет [242] при разделении кальцийцикламата, натрийсахарина, дульцина и P4000 (5-нитро-2-*n*-пропоксанилин) получили величины  $R_f$ , равные соответственно 0,30; 0,41; 0,75 и 0,84. Они проводили разделение на силикагеле смесью бутанол—95 %-ный этанол—28 %-ный аммиак—вода (40:4:1:9). При УФ-облучении с длиной волны 254 нм сахарин дает синее флуоресцирующее пятно, а P4000—темное пятно. После интенсивного опрыскивания 1 %-ным раствором хлоранила в бензоле и последующего нагревания при 100°C в течение 5 мин оба этих соединения были видны как белые пятна на бледно-лиловом фоне. Вслед за этим опрыскивание 1 %-ным раствором *n*-диметиламинобензальдегида в 10 %-ной соляной кислоте позволило обнаружить дульцин в виде ярко-желтого пятна, а P4000 остался бледно-лиловым. Чувствительность метода составляла соответственно 5; 2; 1 и 1 мкг. Войдих и др. [243], сочетая методы экстракции и тонкослойной хроматографии, разделили дульцин, суозан [N-(*n*-нитрофенилкарбамоил)-β-аланин], *n*-метокси-*o*-бензоилбензойную кислоту и Ultra-Sweet (5-нитро-2-*n*-пропоксианилин).

Дигидрохальконовые синтетические заменители сахара разделяли хроматографированием на листках полиамида K541V (Eastman), элюируя смесью нитрометан—метанол (3:2) [244].

## 13. ПОГЛОТИТЕЛИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

Из-за широкого применения поглотителей УФ-излучения в производстве пластиков и глазурей существует потребность в аналитическом методе выделения и идентификации подобных соединений, в частности широко применяемых производных 2-оксибензофенона. Кнаппе и др. [245] определяли характеристики этих и некоторых других поглотителей УФ-излучения методом тонкослойной хроматографии. Они проводили разделение на силикагеле G, кизельгуре G, оксиде алюминия G и порошке целлюлозы G, пропитанных 80—82 %-ным раствором полиэфира адипиновой кислоты и триэтиленгликоля в метилгликоле (Polyester IK 123, Glasurit-Werke). Растворитель представлял собой насыщенную полиэфиром смесь *m*-ксилол—муравьиная кислота (98:2). Авторы свели в таблицу величины  $R_f$ , полученные для восьми производных 2-оксибензофенона, фенилсалицилата, *n*-трет-бутилфенилсалицилата и 2,4-дихлоррезорцина, и цветные реакции, наблюдавшиеся при УФ-облучении, а также при опрыскивании красителем прочный красный AL. Разделение шло в основном по принципам распределительного разделения, на результаты которого, по-видимому, мало влияла подложка.

Добис [246] разработал методику экстрагирования поглотителей УФ-излучения из твердого парафина (применяемого для

изготовления парафинированной бумаги) и затем разделял смесь четырех таких веществ на силикагеле, пропитанном 5 % силикона. В качестве растворителей он использовал ряд смесей метанол—вода и этанол—вода с соотношением компонентов от 3:1 до 9:1.

#### 14. РАЗЛИЧНЫЕ ХИНОНЫ

Барбье [247] добился превосходного разделения смесей *n*-бензохинонов, выделенных из природных источников, проводя элюирование смесью гексан—этилацетат (17:3) на закрепленных крахмалом слоях кремневой кислоты. Поскольку высушенные при 105°C пластинки очень сильно адсорбировали хиноны, перед употреблением их выдерживали 48 ч на воздухе. Петтерсон [248] разделял бензохиноны на слоях силикагеля G, а затем количественно определял их путем экстрагирования и измерения коэффициента поглощения при 270 нм. Выходы экстрагированных продуктов находились в интервале 95—100 %. В этой работе Петтерсон применял также двумерное разделение. В другой работе [249] он выделил несколько толухинонов из *Aspergillus fumigatus*.

Грау и Эндрес [250] хроматографировали ряд хинонов на ацетилированном полиамиде, поскольку некоторые из этих соединений необратимо адсорбируются на неацетилированном полиамиде. Элюирующими растворителями служили смеси метанол—вода (1:1) и ацетон—вода (3:1).

#### 15. ПРОЧИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Нили [251] разделял на силикагеле G ряд полифениленовых эфиров многократным элюированием смесью бензол—циклогексан (5:95). Для получения четкого разделения достаточно провести двукратное элюирование; четырехкратное элюирование, естественно, дает еще лучшее разделение. Перед каждым повторным элюированием нужно вновь активировать пластинки при 110°C в течение получаса, но это не вызывает деструкции полифениленовых эфиров, являющихся жидкой основой для высокотемпературных смазочных материалов и обладающих исключительной термической устойчивостью. Обнаружение пятен проводили с помощью паров иода.

Девять пар изомеров циклоалканов и *трео*—*эритро*-изомеров спиртов, метиловых сложных эфиров, кислот и нитрила были разделены на пластинках с силикагелем и оксидом алюминия [252] методом непрерывного течения Бреннера и Нидервизера [83].

Патель и др. [253] хроматографировали на тонкослойных пластинках экстракт студенистого корма для личинок пчел (ма-

точного желе), извлеченный смесью метанол—хлороформ (1:2). Интересно отметить, что маточный корм остается более или менее постоянным по составу, в то время как пищевой рацион трутней и рабочих пчел изменяется с возрастом личинок и отличается по составу от маточного корма.

Герман и Шнейдер [254] проверили ряд реактивов для фотометрического определения содержания различных веществ. Было показано, что из четырех исследованных веществ только одно является индивидуальным соединением. Например, проба дитизона дала на пластинке с силикагелем три пятна, каждое из которых приобретало различную окраску после обработки основным контрольным раствором, содержащим  $Pb^{2+}$ . Авторы пришли к выводу, что необходимо проверять чистоту реагентов для фотометрического анализа во избежание получения ошибочных значений коэффициента поглощения.

Корте и Фогель [255] хроматографировали лактоны, лактамы и тиолактоны на слоях силикагеля G. Они составили таблицу величин  $R_f$  использованных растворителей: диизопропилового эфира, смеси диизопропиловый эфир—этилацетат (4:1 и 1:4) и смеси диизопропиловый эфир—октан (3:2). Перед обнаружением лактамы переводили в гидроксамовые кислоты опрыскиванием 12,5 %-ным раствором гидроксида натрия в метаноле и 5 %-ным раствором гидрохлорида гидроксиламина в метаноле.

Устемен и др. [256] хроматографировали на слоях силикагеля ряд алкильных, арильных и стероидных эфиров серной кислоты. Сложные эфиры серной кислоты со слабополярными соединениями можно в основном разрешить элюированием смесью бензол—метилэтилкетон—этанол—вода (3:3:3:1), тогда как для разделения более полярных соединений требовался такой более полярный растворитель, как смесь бутанол-1—уксусная кислота—вода (3:1:1). В этой работе дана таблица значений  $R_f$  для группы характерных соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Meyer H., Leistner L., Fleischwirtschaft, 50, 1414 (1970).
2. Fishbein L., Falk H. L., Chromatogr. Rev., 12, 42 (1970).
3. Stoloff L., Clin. Toxicol., 5, 465 (1972).
4. Schuller P. L., Horwitz W., Stoloff L., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, 1315 (1976).
5. Vanwalbeck W., Scott P. M., Thatcher F. S., Can. J. Microbiol., 14, 131 (1968).
6. Krug G., Teichmann B., Nahrung, 19, 255 (1975).
7. Jacobson W. C., Harmeyer W. C., Wiseman H. G., J. Dairy Sci., 54, 21 (1971).
8. Masri M. S., J. Am. Oil Chem. Soc., 47, 61 (1970).

9. *Purchase I. F. H., Steyn M.*, Brit. J. Cancer, **23**, 800 (1969).
10. *Lamjft K.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **150**, 130 (1972).
11. *Lemieszek-Chodorowska K.*, Roczn. Panstw. Zakl. Hig., **18**, 563 (1967).
12. *Cucullu A. F., Lee L. S., Pons W. A., Goldblatt L. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **47**, 226 (1970).
13. *Velasco J.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **53**, 611 (1970).
14. *Masri M. S., Page J. R., Garcia V. C.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **52**, 641 (1969).
15. *Hagan S. N., Tietjen W. H.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 620 (1975).
16. *Yin L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **52**, 880 (1969).
17. *Brown N. L., Nesheim S., Stack M. E., Ware G. M.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 1437 (1973).
18. *Altenkirk B.*, J. Chromatogr., **65**, 456 (1972).
19. *Leistner L.*, Fleischwirtschaft, **55**, 985 (1975).
20. *Crowther P. C.*, Analyst (London), **93**, 623 (1968).
- 20a. *Roberts B. A., Patterson D. S. P.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 1178 (1975).
21. *Stoloff L., Beckwith A. C., Cushmac M. E.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **51**, 65 (1968).
22. *Stoloff L., Campbell A. D., Beckwith A. C., Nesheim S., Winbush J. S., Jr., Fordham O. M., Jr.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **46**, 678 (1969).
23. *Heathcote J. G., Hibbert J. R.*, J. Chromatogr., **108**, 131 (1975).
24. *Stubblefield R. D., Shotwell O. L., Shannon G. M.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **55**, 762 (1972).
25. *Reddy T. V., Viswanathan L., Venkitasurbramanian T. A.*, Anal. Biochem., **38**, 568 (1970).
26. *Engstrom G. W.*, J. Chromatogr., **44**, 128 (1969).
27. *Schuller P. L., Verhuelsdonk C. A. H., Paulsch W. E.*, Arzneimittel-Forsch., **20**, 1517 (1970).
28. *Scott P. M., Kennedy B. P. C.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 1452 (1973).
29. *Yin L., Campbell A. D., Stoloff L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 102 (1971).
30. *Peterson R. E., Ciegler A.*, J. Chromatogr., **31**, 250 (1967).
31. *Tuinstra L. G. M. T., Bronsgeest J. M.*, J. Chromatogr., **111**, 448 (1975).
32. *de Zeeuw R. A., Lillard H. S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 98 (1971).
33. *Stefaniak B.*, J. Chromatogr., **44**, 403 (1969).
34. *Issaq H. J., Barr E. W., Zielinski W. L., Jr.*, J. Chromatogr., **132**, 115 (1977).
35. *Kwon T.-W., Ayres J. C.*, J. Chromatogr., **31**, 420 (1967).
36. *Andrellos P. J., Reid G. R.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **47**, 801 (1964).
37. *Stoloff L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **50**, 354 (1967).
38. *Przybylski W., J.*, Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 163 (1975).
39. *Pohland A. E., Yin L., Dantzman J. G.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **53**, 101 (1970).
40. *Ashoor S. H., Chu F. S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 492 (1975).
41. *Ashoor S. H., Chu F. S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 617 (1975).
42. *Stack M. E., Pohland A. E., Dantzman J. G., Nesheim S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **55**, 313 (1972).
43. *Haddon W. F., Wiley M., Waiss A. C., Jr.*, Anal. Chem., **43**, 268 (1971).
44. *Verrett M. J., Marliac J. P.*, J. Assoc. Off. Agric. Chem., **47**, 1003 (1964).
45. *Clements M. L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **51**, 611 (1968).
46. *Beljaars P. R., Fabry F. H. M.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **55**, 775 (1972).
47. *Beljaars P. R.*, "A Contribution to the Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>, Quinine Hydrochloride and L(+)-ascorbic Acid by Quantitative *in situ* Thin-Layer Chromatographic Analysis", Doctoral Dissertation, Wageningen, 1974.
48. *Toth L., Tauchmann F., Leistner L.*, Fleischwirtschaft, **50**, 1235 (1970).
49. *Pons W. A., Jr.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 870 (1971).
50. *Ayers J. L., Sinnhuber R. O.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **43**, 423 (1966).
51. *Pons W. A., Jr., Cucullu A. F., Franz A. O., Jr., Goldblatt L. A.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **45**, 694 (1968).
52. *Berman M. R., Zare R. N.*, Anal. Chem., **47**, 1200 (1975).
53. *Kiermeier F., Groll D.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **142**, 120 (1970).
54. *Duračková Z., Betina V., Nemeč P.*, J. Chromatogr., **116**, 141 (1976).
55. *Steyn P. S., Merwe K. J.*, Nature, **211**, 418 (1966).
56. *Nesheim S., Hardin N. F., Francis O. J., Jr., Langham W. S.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **56**, 817 (1973).
57. *Broce D., Grodner R. M., Killebrew R. L., Bonner F. L.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **53**, 616 (1970).
58. *Stoloff L., Nesheim S., Yin L., Rodricks J. V., Stack M., Campbell A. D.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 91 (1971).
59. *Stack M., Rodricks J. V.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 86 (1971).
60. *Schmidt I., Rehm H.-J.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **139**, 20 (1968).
61. *Eppley R. M.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **58**, 906 (1975).
62. *Oelrichs P. B., Muller W. A.*, Toxicol., **10**, 63 (1972).
63. *Scott P. M., Coldwell B. B., Weiberg G. S.*, Food Cosmet. Toxicol., **9**, 179 (1971).
64. *Hou C. T., Ciegler A., Hasseltine C. W.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 1035 (1971).
65. *Hayes A. W., McCain H. W.*, Food Cosmet. Toxicol., **13**, 221 (1975).
66. *Damodaran C., Ramadoss C. S., Shanmugasundaram E. R. B.*, Anal. Biochem., **52**, 482 (1973).
67. *Scott P. M., Miles W. F., Toft P., Dubé J. G.*, J. Agric. Food Chem., **20**, 450 (1972).
68. *Pohland A. E., Allan R.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **53**, 686 (1970).
69. *Reiss J.*, Naturwissenschaften, **59**, 37 (1972).
70. *Reiss J.*, Microchim. Acta, **1975**, 473.
71. *Alperden I., Mintzclaff H.-J., Tauchmann F., Leistner L.*, Fleischwirtschaft, **53**, 566 (1973).
72. *Engel G.*, J. Chromatogr., **130**, 293 (1977).
73. *Iwasaki T., Kosikowski F. V.*, J. Food Sci., **38**, 1162 (1973).
74. *Kem W. R., Abbott B. C., Coates R. M.*, Toxicol., **9**, 15 (1971).
75. *Sullivan G., Maness D. D., Yakatan G. J., Scholler J.*, J. Chromatogr., **116**, 490 (1976).
76. *Pero R. W., Owens R. G., Harvan D.*, Anal. Biochem., **43**, 80 (1971).
77. *Steyn P. S.*, J. Chromatogr., **45**, 473 (1969).
78. *Duračková Z., Betina V., Nemeč P.*, J. Chromatogr., **116**, 155 (1976).
79. *Gedek B.*, Zentralbl. Veterinärmed., Reihe B, **19**, 15 (1972).
80. *Diell A.*, Allgem. Papierrundsch., **1962**, 1262.
81. *Anderson R. H., Huntley T. E., Schwecke W. M., Nelson J. H.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 349 (1963).
82. *Seher A.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **61**, 345 (1959).
83. *Seher A.*, J. Soc. Cosmet. Chem., **13**, 385 (1962).
84. *Meyer H.*, Dtsch. Lebensm.-Rundsch., **57**, 170 (1961).
85. *Ishikawa S., Katsui G.*, Bitamin, **30**, 203 (1964); Chem. Abstr., **62**, 806 (1965).
86. *Jonas J.*, J. Pharm. Belg., **17**, 103 (1962).
87. *Zentz C.*, Sonderh. Z. Landwirtschaft. Forsch., **18**, 152 (1964); Chem. Abstr., **62**, 2241 (1965).
88. *Salo T., Salminen K.*, Z. Lebensm. Unters.-Forsch., **125**, 167 (1964).
89. *Davidek J.*, J. Chromatogr., **9**, 363 (1962).
90. *Davidek J., Pokorný J.*, Rev. Univ. Ind. Santander (Columbia), **4**, 111 (1962).
91. *Davidek J., Pokorný J.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **115**, 113 (1961).
92. *Wang R. T., Chou S. S.*, J. Chromatogr., **43**, 522 (1969).

93. Lee S. C., Hua Hsueh., 1968, 155; Anal. Abstr., 18, 2780 (1970).
94. Daniels D. G. H., King H. G. C., Martin H. F., J. Sci. Food Agr., 14, 385 (1963).
95. Sahasrabudhe M. R., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 888 (1964).
96. Amano R., Kawada K., Kawashiro I., Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 5, 333 (1964); Chem. Abstr., 61, 15266 (1964).
97. Rutkowski A., Kozłowska H., Szerszynski J., Roczn. Panstw. Zakł. Hig., 14, 361 (1963).
98. Slonaker D. F., Sievers D. C., Anal. Chem., 36, 1130 (1964).
99. van der Heide R. F., Wouters O., Lebensm.-Unters.-Forsch., 117, 129 (1962).
100. Dobies R. S., J. Chromatogr., 40, 110 (1969).
101. van der Heide R. F., Masgdenberg A. C., van der Neut J. H. Chem. Weekbl., 61, 440 (1965).
102. Miles D. T., Analyst (London), 99, 724 (1974).
103. Simpson D., Currell B. R., Analyst (London), 96, 515 (1971).
104. Delves R. B., J. Chromatogr., 26, 296 (1967).
105. Cox R., J. Chromatogr., 105, 57 (1975).
106. Coates J. P., J. Inst. Petrol., 57, 209 (1971).
107. Amos R., J. Inst. Petrol., 54, 9 (1968).
108. Crump G. B., Anal. Chem., 36, 2447 (1964).
109. Higgins G. M. C., McSweeney G. P., Rubber Chem. Technol., 47, 1206 (1974).
110. Ibaria Rueda L., Gonzales Hernandez L., Rev. Plast. Mod., 24, 82 (1973).
111. Sluzewska L., Roczn. Panstw. Zakł. Hig., 25, 495 (1974); Anal. Abstr., 28, 6081 (1975).
112. Ivan G., Ciutacu R., J. Chromatogr., 88, 391 (1974).
113. Kreiner J. G., Warner W. C., J. Chromatogr., 44, 315 (1969).
114. Nagasawa K., Ohia K., Bunseki Kagaku, 16, 1285 (1967); J. Chromatogr., 37, D86 (1968).
115. Kreiner J. G., Rubber Chem. Technol., 44, 381 (1971).
116. Harthorn J. G. L., Acta Chem. Scand., 15, 1401 (1961).
117. Fauth M. I., Roecker G. W., J. Chromatogr., 18, 608 (1965).
118. Rao K. R. K., Bhalis A. K., Sinha S. K., Current Sci. (India), 33, 12 (1964).
119. Hansson J., A. Alm. J. Chromatogr., 9, 385 (1962).
120. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 14, 65 (1964).
121. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 16, 488 (1964).
122. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 50, 453 (1970).
123. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 71, 481 (1972).
124. Hansson J., Explosivstoffe, 10, 73 (1963).
125. Chandler C. D., Kohlbeck J. A., Bolleter W. T., J. Chromatogr., 64, 123 (1972).
126. Midkiff C. R., Washington W. D., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 1092 (1974).
127. Midkiff C. R., Jr., Washington W. D., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, 1357 (1976).
128. Hoffsommer J. C., Glover D. J., J. Chromatogr., 62, 417 (1971).
129. Hoffsommer J. C., J. Chromatogr., 51, 243 (1970).
130. Archer A. W., J. Chromatogr., 108, 401 (1975).
131. Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Chromatogr., 31, 551 (1967).
132. Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Chromatogr., 31, 120 (1967).
133. Parihar D. B., Prakash O., Bajaj I., Tripathi R. P., Verma K. K., Microchim. Acta, 1971, 393.
134. Tuerler M., Hoegl D., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 52, 123 (1961).
135. Buerger K., Z. Anal. Chem., 192, 280 (1962).
136. Neubert G., Z. Anal. Chem., 203, 265 (1964).
137. van der Heide R. F., Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 124, 198 (1964).
138. van der Heide R. F., Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 124, 3481 (1964).
139. Koch J., Figge K., J. Chromatogr., 109, 89 (1975).
140. Schloegl K., Pelousek H., Mohar A., Monatsh. Chem., 92, 533 (1961).
141. Schloegl K., Mohar A., Peterlik M., Monatsh. Chem., 92, 921 (1961).
142. Schloegl K., Pelousek H., Ann. Chem., 651, 1 (1962).
143. Schloegl K., Peterlik M., Tetrahedron Lett., 1962, 573.
144. Schloegl K., Peterlik M., Seiler H., Monatsh. Chem., 93, 1309 (1962).
145. Schloegl K., Peterlik M., Monatsh. Chem., 93, 1328 (1962).
146. Schloegl K., Egger H., Monatsh. Chem., 94, 376 (1963).
147. Schloegl K., Fried M., Monatsh. Chem., 94, 537 (1963).
148. Schloegl K., Fried M., Tetrahedron Lett., 1963, 1473.
149. Вобецки М., Хефедов В. Д., Синотова Е. Н., Журн. Общ. хим., 33, 4023 (1963).
150. Vobecky M., Hefedov V. D., Sinotova E. N., J. Chromatogr., 30, D1 (1967).
151. Johnson G. W., Vickers C., Analyst (London), 95, 356 (1970).
152. Tatton J. O'G., Wagstaffe P. J., J. Chromatogr., 44, 284 (1969).
153. Takeshita R., Akagi H., Fujita M., Sakagami Y., J. Chromatogr., 51, 283 (1970).
154. Fishbein L., Chromatogr. Rev., 13, 83 (1970).
155. Druding L. F., Shupack S. I., J. Chromatogr., 24, 491 (1966).
156. Klement R., Wild A., Z. Anal. Chem., 195, 180 (1963).
157. Donner R., Lohs Kh., J. Chromatogr., 17, 349 (1965).
158. Reuter H., Hanke H., Pharm. Zentralhalle, 104, 323 (1965).
159. Schindlbauer H., Mitterhofer F., Angew. Chem., Int. Engl. Ed., 5, 680 (1966).
160. Lamotte A., Porthault M., Merlin J.-C., Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 919.
161. Lamotte A., Merlin J.-C., J. Chromatogr., 38, 296 (1968).
162. Lamotte A., Merlin J.-C., J. Chromatogr., 45, 432 (1969).
163. Lamotte A., Francina A., Merlin J.-C., J. Chromatogr., 44, 75 (1969).
164. Bloom P. J., J. Chromatogr., 75, 261 (1973).
165. Иванова Н. П., Завалишина А. И., Фурсенко И. В., Насоновский И. С., Коняева И. П., Комлев И. В., Нифантьев Э. Е., Журн. Общ. хим., 42, 91 (1972).
166. Petschik H., Steger E., J. Chromatogr., 31, 369 (1967).
167. de Licastro S. A., Riveda M. A., J. Chromatogr., 92, 207 (1974).
168. Neubert G., J. Chromatogr., 20, 342 (1965).
169. Масстрокова Т. А., Сахарова Т. Б., Кабачник М. И., Изв. АН СССР, Сер. хим., 1963, 2211.
170. Petschik H., Steger E., J. Chromatogr., 9, 307 (1962).
171. Petschik H., Steger E., J. Chromatogr., 7, 135 (1962).
172. Ertel H., Horner L., J. Chromatogr., 7, 268 (1962).
173. Stephan R., Erdman J. G. Nature, 203, 749 (1964).
174. Curtis R. F., Phillips G. T., J. Chromatogr., 9, 366 (1962).
175. Mayer R., Rosmus P., Fabian J., J. Chromatogr., 15, 153 (1964).
176. Fishbein L., Fawkes J., J. Chromatogr., 22, 323 (1966).
177. Караулова Е. Н., Бобруйская Т. С., Гальперн Г. Д., Журн. Анал. хим., 21, 893 (1966).
178. Снеготский В. И., Снеготская В. А., Завод. лаб., 35, 429 (1969).
179. Novitskaya N. N., Zhuravleva L. E., Ivanova L. P., J. Chromatogr., 43, D45 (1969).
180. Prinzier H. W., Pape D., Terppe M., J. Chromatogr., 19, 375 (1965).
181. Prinzier H. W., Tauchmann H., Tzscharnke C., J. Chromatogr., 29, 151 (1967).
182. Prinzier H. W., Pape D., Tauchmann H., Terppe M., Tzscharnke C., Ropa Uhlie, 8, 13 (1966).
183. Hiley R. W., Cameron A., J. Chromatogr., 107, 393 (1975).
184. Wolfrom M. L., Horton D., Hutson D. H., Org. J. Chem., 28, 845 (1963).
185. Kaufmann H. P., Makus Z., Fette, Seifen, Anstrichm., 62, 1014 (1960).
186. Kaunitz H., Malins D. C., McKay D. G., J. Exp. Med., 115, 1127 (1962).

187. *Morris L. J., Holman R. T., Fontell K.*, J. Lipid Res., **2**, 68 (1961).
188. *Acker L., Greve H.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 1009 (1963).
189. *Neywald F., Fetting K. E.*, Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg., **108**, 1490 (1963).
190. *Schauenstein E., Esterbauer H.*, Monatsh. Chem., **94**, 164 (1963).
191. *Subbarao R., Roomi M. W., Subbaram M. R., Achaya K. T.*, J. Chromatogr., **9**, 295 (1962).
192. *Privett O. S., Nickell E. C.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 72 (1964).
193. *Privett O. S., Blank M. L.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 70 (1963).
194. *Privett O. S., Nickell E. C.*, J. Lipid Res., **4**, 208 (1963).
195. *Privett O. S., Blank M. L.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 520 (1962).
196. *Knapp E., Peteri D.*, Z. Anal. Chem., **190**, 386 (1962).
197. *Kačič R., Plesničar B.*, J. Chromatogr., **38**, 515 (1968).
198. *Сорокина А. Н., Батог А. Е., Романцевич М. К.*, Журн. Общ. хим., **37**, 766 (1967).
199. *Бузланова М. М., Степановская В. Ф., Антоновский В. Л.*, Журн. Анал. хим., **21**, 1491 (1966).
200. *Mandava N.*, Am. Lab., **6**, 27 (1973).
201. *Kutáček M., Rosmus J., Deyl Z.*, Biol. Plant. Acad. Sci. Bohemoslov., **4**, 226 (1962).
202. *Sembdner G., Gross R., Schreider K.*, Experientia, **18**, 584 (1962).
203. *MacMillan J., Suter P. J.*, Nature, **197**, 790 (1963).
204. *Ikekawa N., Kagawa T., Sumiki T.*, Proc. Japan Acad., **39**, 507 (1963).
205. *Kagawa T., Fukinbara T., Sumiki T.*, Agric. Biol. Chem. (Tokyo), **27**, 598 (1963).
206. *Cavell B. D., MacMillan J., Price R. J., Sheppard A. C.*, Phytochemistry, **6**, 867 (1967).
207. *Musgrave A.*, J. Chromatogr., **36**, 388 (1968).
208. *Stahl E., Kaldewey H.*, J. Physiol. Chem., **323**, 182 (1961).
209. *Ballin G.*, J. Chromatogr., **16**, 152 (1964).
210. *Kaldewey H., Stahl E.*, Planta, **62**, 22 (1964).
211. *Kaldewey H.*, Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci. (Paris), **123**, 421 (1963, publ. 1964).
212. *Dubouchet J., Pilet P.-E.*, Ann. Physiol. Veg., **5**, 175 (1963).
213. *Collet G.*, Compt. Rend., **259**, 871 (1964).
214. *Railton I. D.*, J. Chromatogr., **70**, 202 (1972).
215. *Raj R. K., Hutzinger O.*, Anal. Biochem., **33**, 471 (1970).
216. *Copijs-Peereboom J. W.*, J. Chromatogr., **4**, 323 (1960).
217. *Jaminet F.*, Farmaco (Pavia), Ed. Prat., **18**, 633 (1963).
218. *Braun D.*, Kunststoffe-Plastics, **52**, 2 (1962).
219. *Bloom P. J.*, J. Chromatogr., **72**, 35 (1972).
220. *Groebel W.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **137**, 7 (1968).
221. *Haase H.*, Kautsch., Gummi, Kunstst., **21**, 9 (1968).
222. *Kreiner J. G.*, J. Chromatogr., **75**, 271 (1973).
223. *Braun D., Geenen H.*, J. Chromatogr., **7**, 56 (1962).
224. *Obruba K.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **27**, 2968 (1962); Chem. Abstr., **58**, 9337 (1963).
225. *Thoma K., Rombach R., Ullmann E.*, Arch. Pharm., **298**, 19 (1965).
226. *Anker L., Sonanini D.*, Pharm. Acta Helv., **37**, 360 (1962).
227. *Seher A.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **66**, 371 (1964).
228. *Seher A., Janssen J.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **72**, 773 (1970).
229. *Koenig H.*, Z. Anal. Chem., **251**, 167 (1970).
230. *Stancher B., Gabrielli L. F., Favretto L.*, J. Chromatogr., **111**, 459 (1975).
231. *Mangold H. K., Kammereck R.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 201 (1962).
232. *Hofmann A. F.*, "Thin-Layer Adsorption Chromatography of Lipids", in "Biochemical Problems of Lipids", Frazer A. C., Ed., Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 1.
233. *Takagi T., Fukuzumi K.*, Yukagaku, **13**, 520 (1964).
234. *Desmond C. T., Borden W. T.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 552 (1964).
235. *Allen M. A., Martin T. T.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **48**, 790 (1971).
236. *Hordyńska S., Legatowa B.*, Roczn. Panstw. Zakl. Hig., **18**, 189 (1967).
237. *Takeshita R., Jinnai M., Yoshida H.*, J. Chromatogr., **123**, 301 (1976).
238. *Groves M. J., Mustaja R. M. A.*, J. Chromatogr., **97**, 297 (1974).
239. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем./Под ред. Э. Штала, М.: Мир, 1965, гл. 13, с. 249.
240. *Salo T., Airo E., Salminen K.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **124**, 20 (1964).
241. *Salo T., Salminen K.*, Suom. Kemistil., **A37**, 161 (1964).
242. *Korbelak T., Bartlett J. N.*, J. Chromatogr., **41**, 124 (1969).
243. *Woldich H., Gnauer H., Tunka J.*, Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., **147**, 284 (1971).
244. *Gentili B., Horowitz R. M.*, J. Chromatogr., **63**, 467 (1971).
245. *Knapp E., Peteri D., Rohdewald I.*, Z. Anal. Chem., **197**, 364 (1963).
246. *Dobies R. S.*, J. Chromatogr., **35**, 370 (1968).
247. *Barbier M.*, J. Chromatogr., **2**, 649 (1959).
248. *Pettersson G.*, J. Chromatogr., **12**, 352 (1963).
249. *Pettersson G.*, Acta Chem. Scand., **17**, 1771 (1963).
250. *Grau W., Endres H.*, J. Chromatogr., **17**, 585 (1965).
251. *Nealey R. H.*, J. Chromatogr., **14**, 120 (1964).
252. *Maugras M., Robin Ch., Gay R.*, Bull. Soc. Chim. Biol. **44**, 887 (1962).
253. *Patel N. G., Haydak M. H., Lovell R.*, Nature, **191**, 362 (1961).
254. *Gehrmann J., Schneider F. L.*, Microchem. J., **6**, 561 (1962).
255. *Korte F., Vogel J.*, J. Chromatogr., **9**, 381 (1962).
256. *Wusteman F. S., Dodgson K. S., Lloyd A. G., Rose F. A., Tudball N.*, J. Chromatogr., **16**, 334 (1964).

## 1. КАТИОНЫ

## Разделение на слоях силикагеля и целлюлозы

Первая работа по тонкослойной хроматографии неорганических веществ выполнена в 1949 г. Мейнгардом и Холлом [1] на смеси оксида алюминия и целита, закрепленных крахмалом. В этой работе проводили разделение цинка и железа посредством круговой хроматографии. В настоящее время предложенная методика представляет главным образом исторический интерес. Можно, однако, производить разделение и на силикагеле. Поскольку силикагель содержит примеси, в состав которых входят натрий, магний, кальций и железо, надо сначала удалить эти примеси путем промывания кислотой и водой [2]. (Описание этой операции см. в т. 1, гл. III, разд. 2.) При такой обработке вымывается сульфат кальция, выполняющий функцию закрепляющего вещества. Поэтому надо дополнительно вносить сульфат кальция, если желательно с его помощью закрепить слой, или заменить крахмалом, если нельзя использовать закрепленные гипсом слои. Выпускается также специально очищенный силикагель MNHR. Зейлер [3] изучал разделение катионов и нашел, что результаты зависят от ионообменных свойств адсорбента и от координационной способности растворителя.

Среди обзоров на эту тему надо указать обзоры Меркуса [4], Ледерера [5], Лезинганга-Бухтелы [6], Волянца и Ермакова [7], Герела [8] и Такитани и Каванабе [9]. Меркус [10] опубликовал также обзор по разделению на целлюлозе, а Фишбейн [11] — по хроматографии соединений ртути. Бринкмен и Де Фриз [11a] собрали данные по тонкослойной хроматографии.

**Группа сероводорода.** Зейлер и Зейлер [2] использовали для разделения ионов этой группы слои очищенного силикагеля, закрепленные гипсом. Они проводили разделение меди, ртути, висмута, кадмия и свинца в условиях насыщения в камере, используя как растворитель смесь *n*-бутанол—1,5 н. соляная кислота—ацетониллацетон (100:20:0,5). Для обнаружения разделенных компонентов пластинки опрыскивали 2%-ным раствором иодида калия, сушили, подвергали действию паров аммиака, а затем помещали в заполненный сероводородом

приемник, где пятна окрашивались в следующие цвета (порядок перечисления соответствует возрастанию  $R_f$ ):  $\text{Cu}^{2+}$  темно-коричневый,  $\text{Pb}^{2+}$  коричневый,  $\text{Cd}^{2+}$  желтый,  $\text{Bi}^{3+}$  коричнево-черный и  $\text{Hg}^{2+}$  коричнево-черный. Разделение ионов тяжелых металлов (таллия, меди, свинца, мышьяка, кадмия, сурьмы, висмута и ртути), производимое при судебных экспертизах, исследовалось Кюнци и сотр. [12, 13]. На том же адсорбенте, что и в работе [2], с применением различных комплексообразующих реагентов и органических растворителей, обнаружено, что наилучшим растворителем является смесь 100 мл бензольно-ацетонного раствора (3:1), насыщенного винной кислотой и 6 мл 10%-ной азотной кислоты. Однако в этом растворителе пятно ртути может налагаться на пятно висмута и пятно свинца налагается на пятно меди, а кадмий дает три пятна. С помощью смеси метанол—ацетонитрил—азотная кислота (пропорции не указаны) можно селективно отделить таллий ( $R_f$  0,72) от остальных ионов, которые перемещались с фронтом или вблизи фронта растворителя. Отмечается [2, 12, 13], что не следует обращать внимание на абсолютные значения  $R_f$ , так как они зависят от состава разделяемой смеси. Для оценки результатов важны только относительная последовательность пятен ион и их цвет после опрыскивания различными обнаруживающими реагентами. С растворителем Кюнци пятна разделяемых ионов располагаются в следующей последовательности:  $\text{Hg} > \text{Bi} > \text{Sb} > \text{Cd} > \text{As} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Tl}$ . Некоторые цветные реакции для различных ионов этой группы указаны в табл. 33.1. Сотрудники Кюнци применили разработанный метод для решения практических задач по количественному определению содержания некоторых металлов, например мышьяка в муке, таллия в крови, ртути в моче и мышьяка и кадмия в чае. Для количественной оценки размеры полученных пятен сопоставляли с размерами пятен при работе со стандартными растворами. Стандартное отклонение при определении содержания мышьяка и кадмия в чае составляло 10%, а при определении ртути в моче — 0,5 мг-%; причем для проведения анализа требовалось всего 3 ч, в то время как анализ электролитическим методом занимал 12 ч, а стандартное отклонение для последнего метода составляло 0,4—0,5 мг-%.

Джохи и Каушик [14] разделяли на силикагеле  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Hg}^{2+}$ , элюируя смесью *n*-бутанол—1,5 н. соляная кислота—метилэтилкетон (75:15:2). Для разделения ионов  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Sb}^{2+}$  и  $\text{Sn}^{2+}$  они использовали смесь *n*-бутанол—1 М винная кислота—3 н. соляная кислота (10:1:1). Обнаружение пятен производили с помощью тиокарбоната калия (Т-125), причем чувствительность изменялась от 1,27 до 11,85 мкг. Джохи и Мехра [15] разделяли  $\text{Hg}^+$  и  $\text{Hg}^{2+}$  смесью *n*-бутанол—



Цветные реакции некоторых катионов группы сероводорода

Катион	Дитизон [12, 13]		$(\text{NH}_4)_2\text{S}$ [12, 13]	KI [2]	$\text{H}_2\text{S}$ [2]
	в кислой среде	в щелочной среде ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )			
$\text{Hg}^{2+}$	Розовая	Оранжево-красная	Черная	Красная	Коричнево-черная
$\text{Bi}^{3+}$	Пурпурная	Красно-оранжевая	Коричневая	Красно-желтая	Коричнево-черная
$\text{Sb}^{3+}$	Красноватая	Светло-коричневая	Оранжевая		
$\text{Cd}^{2+}$	Сиреневая	Оранжевая	Желтая		Желтая
$\text{As}^{5+}$	Желтая		"	Желто-коричневая	Коричневая
$\text{Pb}^{2+}$		Розовая	Коричневая	Коричневая	Темно-коричневая
$\text{Cu}^{2+}$	Желто-зеленая	Серо-коричневая	"		
$\text{Tl}^{+}$		Розовая	Черная		

3 н. соляная кислота—2 %-ная винная кислота (4:1:1);  $\text{Sb}^{3+}$  и  $\text{Sb}^{5+}$  — смесью трет-бутанол—2 н. соляная кислота (4:1), а  $\text{Tl}^{+}$  и  $\text{Tl}^{3+}$  — смесью трет-бутанол—уксусная кислота (2:1). Баффи и др. [16] изучали хроматографические характеристики 60 неорганических ионов на целлюлозе, элюируя смесью винная кислота—вода—этанол, а также смесью винная кислота—вода—этанол—аммиак. Разделение ионов  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$  можно производить на силикагеле G смесью амилацетат—соляная кислота (плотность 1,16) [17].  $\text{As}^{3+}$  и  $\text{As}^{5+}$  разделены на силикагеле, содержащем 5 % сульфата кальция, при использовании в качестве растворителя смеси ацетон—15 М ортофосфорная кислота (50:1) [18].

Рай и Кукрея [19] разделяли на силикагеле диэтилдитиокарбаматные комплексы ионов  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  и  $\text{Pd}^{2+}$ , используя как растворители бензол, толуол, ксилол и смесь хлороформ—тетрахлорид углерода (1:1). Зенф [20] использовал смесь *n*-гексан—хлороформ—диэтиламин (20:2:1) для разделения на силикагеле тех же комплексов с ионами  $\text{Pb}^{2+}$  ( $R_f$  0,00),  $\text{Bi}^{2+}$  ( $R_f$  0,27),  $\text{Cd}^{2+}$  ( $R_f$  0,34),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $R_f$  0,44) и  $\text{Hg}^{2+}$  ( $R_f$  0,56). Шведт и Липпман [21] применяли тот же самый комплексобразователь для разделения на силикагеле Zn, Cu, Ni, Pb, Hg и Cd смесью бензол—гексан (5:1).

Хранисавлевич-Яковлевич и др. [22] хроматографировали на силикагеле G дитизонаты ртути, свинца, меди, висмута, кадмия и цинка, применив как элюирующий растворитель смесь бензол—метилхлорид (5:1). Они получили следующие значения  $R_f$ :  $\text{Cd}^{2+}$  0,13;  $\text{Bi}^{3+}$  0,37;  $\text{Pb}^{2+}$  0,34;  $\text{Cu}^{2+}$  0,48;  $\text{Zn}^{2+}$  0,50 и  $\text{Hg}^{2+}$  0,58. Из других растворителей для разделения на силикагеле комплексов дитизона применяли бензол, толуол, ксилол и смесь тетрагидрофуран—хлороформ (5:2) [23]. Грегорович и др. [24] на смешанном адсорбенте силикагель G—кизельгур (7:3) смешанным растворителем бензол—дихлорметан—гептан (25:27:10) проверил разделение цинка ( $R_f$  0,41), меди ( $R_f$  0,37), никеля ( $R_f$  0,34), кобальта ( $R_f$  0,29), свинца ( $R_f$  0,24), висмута ( $R_f$  0,20) и кадмия ( $R_f$  0,05) в виде комплексов с дитизоном. Бодо и сотр. [25] для выделения и идентификации серебра, кадмия, кобальта, меди, ртути, никеля, свинца и цинка при токсикологическом анализе использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле 60 (фирмы Merck) в сочетании с предварительной экстракцией в дитизон—тетрахлорид углерода. Экстракцию проводили при четырех значениях pH, а элюирующим растворителем служил бензол при длине пути элюирования 6—7 см.

Цунода и др. [26—28] хроматографировали хелаты металлов с ацетилацетоном и этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA), а именно хелаты кобальта, марганца, никеля, меди,

хрома и железа. Для трехвалентных металлов, образующих хелаты посредством шести координационных связей, получены более высокие значения  $R_f$ , чем для двухвалентных металлов, дающих четыре координационные связи. Ряд экспериментов по разделению произведен на силикагеле и оксиде алюминия. Масооми и Хейуорт [29] изучали 15 систем растворителей с целью разделения комплексов хрома, марганца, железа, кобальта, меди, никеля, цинка, кадмия и ртути с EDTA на микрокристаллической целлюлозе, а Вандердеелен [30] хроматографировал комплексы кобальта, меди, никеля, марганца, хрома и железа с EDTA на силикагеле без связующего, причем в качестве подвижной фазы использовалось три растворителя.

Верма и Рай [31] разделяли на силикагеле G цинк, медь, кадмий, никель и кобальт в виде роданидных комплексов. Роданид аммония вводили непосредственно в растворители. Хорошее разделение получено при элюировании смесью роданид аммония — *n*-бутанол—аммиак (плотность 0,910) — пиридин (4:80:10:10) (масса/объем/объем/объем).

**Группа сульфида аммония.** Зейлер и Зейлер [2] использовали смешанный растворитель ацетон—концентрированная соляная кислота—ацетонилацетон (100:1:0,5) для разделения железа, цинка, кобальта, марганца, хрома, никеля и алюминия на слоях из специально очищенного силикагеля. Для обнаружения пятен хроматограммы подвергали воздействию газообразного аммиака, а затем опрыскивали раствором 0,5 г 8-оксихинолина в 100 мл 60 %-ного спирта и после этого наблюдали в УФ-свете. Расположение пятен после разделения смеси зависело от состава этой смеси (рис. 33.1). Эти же авторы [32] отделили  $UO_2^{2+}$  от смеси ионов  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Al^{3+}$  и  $Th^{4+}$ , используя сложный растворитель, содержащий 50 мл этилацетата, 50 мл насыщенного водой эфира и 2 мл три-*n*-бутилфосфата. При проведении указанного разделения проба наносилась в виде раствора в 4,7 н. азотной кислоте. В результате взаимодействия пробы с элюирующим растворителем происходило образование комплекса уранилнитрата с три-*n*-бутилфосфатом, который легко перемещался в элюирующем растворителе, тогда как другие катионы оставались на старте или около него. После опрыскивания 0,25 %-ным этанольным раствором пиридилазонафтаола удавалось обнаружить  $\geq 1$  мкг урана. Ион галлия  $Ga^{3+}$  был отделен от стократного избытка иона алюминия при элюировании 100 мл ацетона, содержащего 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Для обнаружения галлия необходимо опрыскивание 0,5 %-ным раствором 8-оксихинолина в 60 %-ном этаноле. После опрыскивания пластинку подвергали действию концентрированного аммиака и затем наблюдали под ультрафиолетовым облучением. Лезинганг-Бух-

тела и Бухтела [33] использовали для отделения урана от других ионов смесь метилизобутилкетон—трибутилфосфат—4,7 М азотная кислота (100:1:10). В качестве элюирующего растворителя при разделении титана, циркония, тория, скандия и урана на слоях силикагеля применяли также трибутилфосфат, содержащий различные концентрации азотной кислоты (трибутилфосфат уравнивался с растворами разной концентрации) [34]. Разделение улучшалось при более высоких

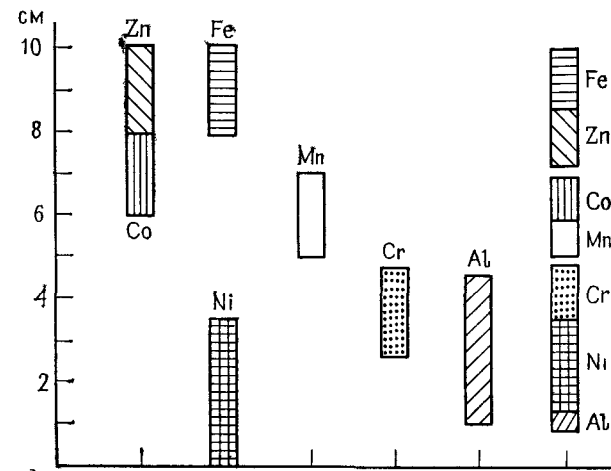


Рис 33.1 Разделение ионов группы сульфида аммония на очищенном силикагеле G при использовании в качестве растворителя смеси ацетон—концентрированная соляная кислота—ацетонилацетон (100:1:0,5). Длина пути элюирования 10 см. Обнаружение производили сначала парами аммиака, а затем опрыскиванием раствором 0,5 г 8-оксихинолина в 100 мл 60 %-ного спирта [2] (с разрешения авторов и Verlag Helvetica Chimica Acta).

концентрациях азотной кислоты. Для отделения урана от тория, циркония и редкоземельных элементов применялась также система бутанол—этоксикаетон—уксусная кислота. Фиппс [35] разделял перренат-, молибдат- и селенит-ионы на силикагеле хроматом (фирмы Eastman); растворителем служил 0,6 М метанольный раствор соляной кислоты, содержащий 10 % воды. Эти ионы не удалось разделить на силикагеле, нанесенном на стеклянные пластинки. Гайбакян и Бабаян [36] разделяли эти же ионы, а также ионы вольфрама на оксиде алюминия, элюируя смесь метанол—3 н. гидроксид натрия (3:1).

Для разделения многих металлов можно также успешно использовать слой целлюлозы. Шольич и Марьянович [37] разделяли Fe, Al, Ga и Ti с помощью бутанола, насыщенного 1 н.

соляной кислотой. Из смеси указанных ионов, содержащей также In, можно отделить небольшие количества Ga путем элюирования смесью *n*-бутанол—вода—соляная кислота (8:1:1) [38]. Гальярди и Бродар [39] исследовали разделение Al, Ga, In, Tl<sup>3+</sup> и Tl<sup>1+</sup> на целлюлозе при элюировании спиртами, содержащими различные концентрации галеноводородных кислот. Зайе и сотр. [40] хроматографировали на целлюлозе ионы Al<sup>3+</sup>, Bi<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Sn<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> смесью соляная кислота—бутанол (1:3). Микетукова и Фрей [41] хроматографировали на силикагеле и на целлюлозе Bi<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, U<sup>6+</sup>, V и Zn<sup>2+</sup> смесью изопропанол—уксусная кислота—6 н. соляная кислота—вода (8:1:1:1); на силикагеле получено лучшее разделение Mn и Ni, чем на целлюлозе. Бухбауэр [42] разделял катионы, которые могут давать ассоциаты с органическими кислотами, входящими в состав лекарьств. Ионы Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Bi<sup>3+</sup> и Hg<sup>2+</sup> разделялись на целлюлозе смесью бутанол—1,5 н. соляная кислота—ацетонилацетон (200:40:1), а Al<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> — смесью уксусная кислота—пиридин—соляная кислота (40:3:10). Меркус [43] сопоставил разделение на целлюлозе различных групп ионов. Лезиганг-Бухтела [44] разделял очень многие катионы на целлюлозе или силикагеле, используя различные сочетания растворителей. Лезиганг-Бухтела и Бухтела [45] отделяли U<sup>6+</sup> от 52 других ионов металлов посредством хроматографирования на силикагеле HR или на целлюлозе верхней фазой смеси метилизобутилкетон—трибутилфосфат—4,7 н. азотная кислота (100:1:10).

Маркль и Хехт [46] применили комплексообразующие реагенты для облегчения разделения ионов методом ТСХ на очищенном силикагеле в условиях насыщения в камере. Элюирующий растворитель состоял из 100 мл смеси диэтилового эфира с этилацетатом (1:1) и 8 мл триизооктиламина. Этот растворитель приводили в равновесие с равным объемом той кислоты, которую использовали для нанесения проб на пластинку. При употреблении в качестве уравнивающей кислоты 1 М раствора серной кислоты можно отделить уран и молибден от железа или от смеси никеля, цинка, марганца и кобальта; однако при отделении урана от молибдена получали пятно молибдена с небольшой примесью урана в нем, а большая часть урана отставала и оставалась около старта. При применении этой методики к хлоридным комплексам и при подкислении исходного раствора 3 н. соляной кислотой ион Fe<sup>3+</sup> образует комплекс и продвигается при элюировании на 4,5—5,0 см, когда фронт растворителя перемещается на 7 см; таким образом, можно отделить этот ион от Ni<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>, которые не обра-

зуют таких комплексов и остаются на старте. То же происходило и со смесью Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>: цинк можно отделить благодаря образованию комплекса. Хороший комплексообразователь—уран—можно отделить таким образом от плохого комплексообразователя—титана. В 8 н. соляной кислоте можно отделить уран от тория, который не дает комплекса. Эти авторы [47] несколько видоизменили методику приготовления пропитанной три-*n*-октиламином бумаги [48, 49]. Предварительно, еще до формирования тонких слоев, силикагель обрабатывали следующим образом. 25 мл эфира, содержащего 2 мл три-*n*-октиламина, встряхивали 2 мин с 50 мл кислоты, которая в дальнейшем употребляется. Затем в этот эфирный раствор добавляли 16,8 г очищенного силикагеля; после испарения эфира силикагель смешивали с 2,4 г алебаstra, необходимым количеством воды и наносили тонкий слой на пластинку. Приготовленные пластинки сушили при 100°C в течение 2 ч. Обработанный таким образом силикагель имеет свойства ионообменной смолы и пригоден для разделений, если использовать в качестве растворителей кислоты в различных концентрациях. Применение 3 н. соляной кислоты делало возможным разделение следующих сочетаний ионов металлов: Fe—Co—Ni, Zn—Co—Ni, Mo—Co—Ni, U—Co—Ni, U—Zr—Th, Zn—Co—Mn, Fe—Zr и Fe—Th. В этом растворителе не удалось разделить U, Mo, Fe, Zn и Ti. Введение в качестве разделяющей среды 1 М серной кислоты, конечно при условии приведения пластинки в равновесие с этой кислотой, позволило получить хорошее разделение Mo и U, а также Mo и Fe. При использовании 8 н. соляной кислоты можно достигнуть хорошего разделения U—Zr—Th и U—Ti—Th. Если в качестве растворителя взята 5 н. азотная кислота, то можно отделить молибден от большинства других катионов. Молибден или уран можно отделить от других ионов на адсорбенте, пропитанном три-*n*-бутилфосфатом.

Для обнаружения различных ионов известно несколько реагентов. Так, для обнаружения молибдена, цинка, марганца и кобальта использовали 10 %-ный раствор 8-оксихинолина в аммиачном спирте, а для обнаружения урана и железа—1 %-ный раствор ферроцианида калия. После обработки пластинок парами аммиака титан обнаруживали с помощью пероксида водорода и цирконий—с помощью кварцетина. Грэм и др. [50—54] и Бринкмен и др. [55—61] исследовали применение для ТСХ силикагеля и целлюлозы, пропитанных разными жидкими анионообменными веществами, использовав для элюирования ряд растворителей.

Рай и Кукрея [62] хроматографировали галлий, индий, таллий, цинк и кадмий в виде их диэтилдитиокарбаматных

комплексов. Они использовали силикагель G и растворители — бензол, толуол или смесь хлороформ—тетрахлорид углерода (1:3). При обнаружении 0,5%-ным этанольным раствором 8-оксихинолина чувствительность составляла 3; 2; 4; 20 и 10 мкг соответственно для каждого элемента. Эти авторы разделяли также  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$  и  $V^{5+}$  в тех же хроматографических системах [17]. Кессиди и сотр. [63] смогли обнаружить 0,1—1 нг  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Bi^{3+}$ , разделяя диэтилдитиокарбаматы этих ионов на слоях активированного силикагеля G. После разделения эти слои опрыскивали реагентом Т-188, содержащим  $Pd^{2+}$ -кальцеин, и наблюдали флуоресценцию в УФ-свете. Самым лучшим растворителем при разделении методом ТСХ была смесь циклогексан—хлороформ (3:7). Олсина и др. [64] разделяли  $Zr^{4+}$  и  $Hf^{4+}$  на силикагеле G с растворителем соляная кислота—фосфорная кислота—вода (10:1:9); указаны полученные в этой системе значения  $R_f$  еще для 41 иона.

**Радиоактивные изотопы и редкоземельные элементы.** Благодаря быстрой тонкослойная хроматография особенно пригодна для разделения изотопов с короткими временами полураспада. Бреччия и Спаллетти [65, 66] отделяли на слоях силикагеля  $^{95}Zr$  от  $^{95}Nb$ . Наилучшее разделение получалось при элюировании растворителем, содержащим 2 г-экв./л HCl и 0,2 г-экв./л HF; соответствующие значения  $R_f$  равны 0,88 и 0,20. Однако при работе с этим растворителем адсорбент, опущенный в растворитель, сползал с пластинки. Можно получить хорошее разделение также со смесью метанол—10 н. фтористоводородная кислота (25:1), причем значения  $R_f$  после 45-минутного хроматографирования равны соответственно 0,03 и 0,05. Для отделения  $^{90}Y$  от  $^{90}Sr$  силикагель подвергали очистке по методу Зейлера и Ротвейлера [67], а затем готовили хроматографические пластинки без закрепляющего вещества. Наилучшим элюентом для разделения этой пары был метанол, содержащий 0,2% EDTA и 10% воды; при продолжительности элюирования 40 мин с этим растворителем получены значения  $R_f$  соответственно 0,16 и 0,85. Радиоактивные изотопы обнаруживали с помощью счетчика Гейгера—Мюллера с окошком, закрытым медной пластинкой, в которой имелась щель  $1 \times 10$  мм. Курода и Огума [68] разделяли  $^{90}Sr$  и  $^{90}Y$  посредством изотопно-обменной тонкослойной хроматографии. В качестве адсорбента они использовали тонкие слои сульфата стронция, а в качестве растворителя—1 н. серную кислоту, а также другие сочетания растворителя и адсорбента. При использовании указанной системы  $^{90}Sr$  удерживался в результате изотопного обмена, а для  $^{90}Y$  получено значение  $R_f \sim 0,90$ .

Боттура и др. [69] выполнили очень широкое исследование по применению комплексообразующих реагентов для разделения продуктов распада  $^{235}U$ . Одна из сделанных ими рекомендаций касается предварительной обработки силикагеля; с целью удаления мешающих примесей слой адсорбента надо обработать комплексообразующими реагентами вместо кислотной обработки, предложенной Зейлером и Ротвейлером [67]. Для сопоставления эффективности адсорбентов на силикагеле, очищенном путем обработки соляной кислотой, и на силикагеле, обработанном EDTA, изучено разделение  $^{140}Ba$  и  $^{140}La$  с помощью одного и того же элюирующего растворителя (0,3 М метанольный раствор соляной кислоты); для первого адсорбента получены значения  $R_f$  0,00 и 0,85 соответственно, а для второго 0,20 и 0,50.  $^{90}Sr$  и  $^{90}Y$  эффективно разделены при использовании в качестве элюирующего растворителя 0,1 М раствора 4,4,4-трифтор-1(2)-тиенилбутандиона-1,3 в метаноле; причем при длине пути элюирования 17,5 см значения  $R_f$  равны соответственно  $\sim 0,25$  и  $\sim 0,8$ .  $^{113}Sn$  и  $^{113}In$  разделяли на очищенном кислотой силикагеле с 0,1 М раствором роданида аммония в метаноле в качестве элюирующего растворителя; при длине пути элюирования 10 см получены значения  $R_f \sim 0,05$  и  $\sim 0,7$  соответственно. Для разделения четырехкомпонентной системы  $^{140}Ba$ — $^{140}La$ — $^{113}In$ — $^{113}Sn$  использовали промытый кислотой силикагель и 0,4 М соляную кислоту в метаноле; при длине пути элюирования 10,5 см получены следующие значения  $R_f$ : Ba 0,00; La 0,74 и Sn 0,82. Хотя  $R_f$  La и Sn близки, определение радиоактивности показало их четкое разделение. Для разделения  $^{141}Ce$ ,  $^{113}Sn$  и  $^{115}Cd$  применяли пластинку с силикагелем, обработанным EDTA, и 0,025 М раствор EDTA, содержащий 8% метанола, как элюент; при длине пути элюирования 14,3 см получены  $R_f$  0,34, 0,69 и 0,85 соответственно. Практически идентичные результаты можно получить, заменив EDTA на роданид аммония. Положения пятен определяли, измеряя радиоактивность, а также сопоставляя полученные хроматограммы с хроматограммами индивидуальных компонентов. Разделение семикомпонентной смеси, содержащей  $^{140}Ba$ ,  $^{140}La$ ,  $^{95}Zr$ ,  $^{181}Hf$ ,  $^{95}Nb$ ,  $^{113}Sn$  и  $^{113}In$ , достигалось при сочетании двумерного и многостадийного элюирования. Первое элюирование проводили 0,3 М метанольным раствором соляной кислоты; затем поворачивали пластинку под прямым углом и элюировали 0,1 М метанольным раствором роданида аммония; для третьего элюирования, проводившегося в том же направлении, что и первое, использовали раствор 2 М HCl+0,2 М HF.

Боттура и Бреччия [70] применяли такую многостадийную методику при разделении образцов реакторного топлива. Полное разделение достигалось посредством двумерной

тонкослойной хроматографии. Для элюирования в первом направлении служила смесь ацетатный буферный раствор—вода—метанол (4:5:41), содержащая 0,01 моль/л EDTA, или смесь вода—метанол (1:10), содержащая EDTA в той же концентрации, а во втором направлении—смесь ацетон—ацетонилацетон—соляная кислота (200:1:2).

Могисси [71] разделил на слоях силикагеля ряд радиоактивных изотопов, используя различные смеси растворителей (табл. 32.2). Пятна нерадиоактивных ионов обнаруживали с помощью типичных реагентов, а пятна радиоактивных ионов—с помощью специально видоизмененного счетчика.

Таблица 32.2

Величины  $R_f$  некоторых радиоактивных изотопов, полученные на силикагеле

Радиоактивный изотоп	$R_f \times 100$	Растворитель
$^{198}\text{Au}$ (коллоидный), $\text{Au}^{3+}$	0; 90	2М HCl в водно-ацетоновом (3:7) растворе
Ba, La, Cs	0; 100; 80	Бутанол—6 н HCl (3:7)
$^{140}\text{Ba}$ , $^{140}\text{La}$	0; 100	Бутанол—6 н HCl (3:7)
$^{133}\text{Ba}$ , $^{133}\text{Cs}$	0; 80	Бутанол—6 н HCl (3:7)
$^{47}\text{Sc}$ , $^{47}\text{Ca}$	10; 80	0,8М $\text{NH}_4\text{SCN}$ в водно-этаноловом (5:3) растворе
Gr, Y	0; 100	4 %-ная $\text{HNO}_3$ ( $d$ 1,52) в смеси эфир—этанол (1:1)
$^{72}\text{Ga}$ , $^{72}\text{Zn}$	10; 60	Бутанол, уравновешенный 1 н HCl
$^{95}\text{Nb}$ , $^{132}\text{Ta}$	10; 80	0,8М HCl+0,1М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ в водно-ацетоновом (1:4) растворе
$^{95}\text{Zr}$ , $^{95}\text{Nb}$	0; 90	0,25М $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ +0,1М HCl в смеси метилэтилкетон—диоксан—вода (1:1:1)

Волынец и Гусева [72] отделяли уран от плутония и транс-плутониевых элементов хроматографированием на силикагеле смесью трибутилфосфат—бензол (1:1); америций, кюрий и плутоний оставались вблизи от старта, в то время как  $\text{U}^{6+}$  двигался вместе с фронтом растворителя. Пробы наносились в виде раствора в 1 М хлорной кислоте. При нанесении проб в растворе 1 М азотной кислоты и элюировании смесью трибутилфосфат—бензол (1:10) можно отделить транс-плутониевые элементы от плутония. Зейлер и Зейлер [73] для разделения  $^{113}\text{Sn}$  и  $^{113}\text{In}$  использовали силикагель Mn S-HR и смесь метанол—2 М NaCl—1 М соляная кислота (90:10:1).

Бабаян и Варшал [74] разделяли редкие металлы на слоях силикагеля, содержащих 10 мг крахмала и 100—150 мг нитрата аммония на 1 г силикагеля. Они проводили элюирование 0,11 М раствором роданистоводородной кислоты в метилэтилкетоне и получили следующие значения  $R_f$ : La 0,08; Ce 0,24; Pr 0,31; Nd 0,38; Sm 0,52; Eu 0,56; Cd 0,60; Y 0,65; Er 0,68 и Yb 0,72. Обнаружение производили с помощью 0,1 %-ного раствора арсеназо I и 35 %-ного раствора уротропина в водном этаноле. Вагина и Волынец [75] разделяли редкоземельные металлы с помощью смесей трибутилфосфат—бензол (1:1 и 1:10), а также воды. Волынец и др. [76] для выделения редкоземельных элементов из уранилнитрата высокой степени частоты использовали в качестве растворителя трибутилфосфат—бензол (1:19). После экстрагирования с силикагеля содержание редкоземельных элементов определяли спектрофотометрически с помощью раствора арсеназо III. Таким образом удавалось определить  $(0,1-10) \cdot 10^{-4}$  % редкоземельных металлов. Метод подходит также для разделения  $\text{Ce}^{3+}$  и  $\text{Ce}^{4+}$  [77]. Th и  $\text{U}^{6+}$  Огума [78] разделял на целлюлозе, элюируя смесями диоксан—12 М соляная кислота (или 14 М азотная кислота) (7:3, 1:1 или 3:7).

Пирс и Флинт [79] разделили смеси редкоземельных элементов на адсорбенте корвик (сополимер винилхлорида и винилацетата), пропитанном бис(2-этилгексил)фосфатом; в качестве элюирующего растворителя использовалась соляная кислота в разных концентрациях. Данеелс и др. [80] разделяли иттрий, иттербий и гадолиний на закрепленных крахмалом слоях силикагеля H, пропитанных 0,4 М хлорной кислотой. В качестве элюирующего растворителя они использовали раствор бис(2-этилгексил)фосфорной кислоты в тетрахлориде углерода, приведенной в равновесие с неподвижной жидкой фазой. При использовании различных модификаций неподвижной жидкой фазы выполнено разделение в следующих системах: Zr—Gd, Eu—Gd и Eu—Gd—Sm.

Хольцапфель и др. [81] применяли пропитанный бис(2-этилгексил)фосфатом силикагель, а как растворители—соляную и азотную кислоты в разных концентрациях. Они смогли разделить практически любые пары из следующих элементов: La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Y и Yb; не удалось разделить только Pr—Nd и Er—Y. При увеличении концентрации пропитывающего раствора и уменьшении толщины слоя разделение улучшалось [82]; проведя двумерное элюирование, можно было разделить почти все редкоземельные элементы.

Группа щелочноземельных металлов. Зейлер [83] разделил металлы этой группы, используя закрепленный крахмалом силикагель, и получил следующую последовательность

(по убыванию значений  $R_f$ ):  $\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba}$ . Он наносил пробы в виде ацетатов, а чтобы предотвратить образование прожилок, добавлял к каждой пробе по 0,001 мл уксусной кислоты. Элюирование производилось смесью этанол—*n*-пропанол—уксусная кислота—ацетилацетон—вода (37,5 : 37,5 : 5 : 1 : 20). После опрыскивания хроматограммы 1,5 %-ным раствором виолуровой кислоты в воде и 20-минутного нагревания при 100°C кальций давал желто-оранжевое пятно, стронций — розовое пятно, а барий — красно-фиолетовое пятно. Меркус [43] разделял на целлюлозе MN 300 барий, стронций, кальций и магний, элюируя смесью метанол—соляная кислота—вода (7 : 1 : 2). Чтобы отделить бериллий от других элементов этой группы, можно применять для элюирования смесь ацетон—соляная кислота—вода (10,3 : 10,5 : 79,2; мол. %) [4]. Для обнаружения использовали реактив Т-145.

Хаммершмидт и Мюллер [84] использовали тонкие слои целлюлозы для определения состава наполнителей бумаги и наносимых на спичечные коробки покрытий для зажигания спичек; с этой целью они производили разделение неорганических катионов. Для очистки целлюлозы MN 300 ее нагревали с 1,5 %-ным раствором азотной кислоты при 50°C в течение 2 ч. Для приготовления пробы сжигали бумагу или покрытия спичечных коробков, остаток (золу) сплавляли в платиновом тигле со щелочью, а затем плав обрабатывали 1 %-ной соляной кислотой. Для хроматографирования использовали камеру сандвичевого типа при длине пути элюирования 10 см. Как элюирующий растворитель применялась смесь этанол—вода—соляная кислота (17,5 : 2,6 : 3,0); получены следующие значения  $R_f$ : барий 0,03; кальций 0,14; магний 0,34; алюминий 0,41; титан 0,49; железо 0,86 и цинк 0,97. Положение пятен определяли после опрыскивания сначала насыщенным раствором ализарина в спирте, а затем 25 %-ным раствором аммиака.

**Группа щелочных металлов.** Металлы этой группы можно разделить в виде ацетатов при хроматографировании на слоях силикагеля, однако силикагель необходимо предварительно очистить; применять гипс как закрепляющее вещество при этом нельзя, потому что эта примесь мешает правильно обнаруживать ионы [67]. Поэтому адсорбент закрепляют крахмалом, а как элюирующий растворитель для разделения ацетатов применяют смесь этанол—уксусная кислота (100 : 1). Если проба находится в виде сульфатов, то их можно непосредственно на пластинке перевести в ацетаты, нанося вместе с пробой эквивалентное количество ацетата бария. При этом проба, содержащая сульфаты щелочных металлов, наносится после ранее нанесенной соли бария. Таким образом, щелочные металлы содержатся уже в виде ацетатов, которые подходят для разделения.

При этом следует удлинить путь элюирования до 15 см, в то время как при непосредственном нанесении ацетатов путь элюирования составляет 10 см. При опрыскивании реагентом, содержащим виолуровую кислоту, образуется красное пятно в точке старта, т. е. там, где эта кислота реагирует с ионом бария. После элюирования пятна ионов щелочных металлов располагаются в следующем порядке (в скобках указаны цвет пятна после реакции с 1,5 %-ным раствором виолуровой кислоты):  $\text{Li}^+$  (светло-красное)  $> \text{Mg}^{2+}$  (желто-оранжевое)  $> \text{Na}^+$  (красно-фиолетовое)  $> \text{K}^+$  (сине-фиолетовое). Зейлер [85] количественно определил натрий, калий и магний после разделения методом ТСХ. После разделения ионов, согласно описанной выше методике, количественное определение отдельных компонентов производили несколькими способами: измерение размеров пятен со стандартным отклонением  $\pm 10\%$ ; непосредственное фотометрирование на денситометре со стандартным отклонением  $\pm 4\%$ ; метод радиоактивных индикаторов со стандартным отклонением  $\pm 1\%$ . Перди и Трутер [86] определяли содержание калия и магния по площади пятна (корень квадратный из площади). Они производили разделение калия и магния (в виде ацетатов) с помощью смеси этанол—метанол (1 : 1), содержащей 1 % уксусной кислоты, а обнаружение пятен — посредством опрыскивания пластинки 1,5 %-ным раствором индикатора фиолетовый кислотный 6 BN.

Янауэр и др. [87] разделяли щелочные металлы в виде их полииодидных комплексов на высушенном на воздухе силикагеле при элюировании 0,1 М раствором иода в смеси нитрометан—бензол (2 : 3). Лезиганг-Бухтела [88] разделял натрий, калий, рубидий и цезий, а также барий, лантан, стронций и иттрий на силикагеле, содержащем 5 % фосфододекамолибдата аммония. При элюировании 0,01 н. соляной кислотой получены следующие  $R_f$ : 0,85; 0,52; 0,21; 0,05; 0,55; 0,12; 0,58; 0,03.

Ханда и Джохри [89] разделили натрий, калий, рубидий и цезий на оксиде алюминия G, отмытом от ионов натрия 0,05 М соляной кислотой. После предварительного элюирования пластинки с адсорбентом сушили и активировали. При элюировании фенолом, предварительно уравновешенным 6 н. соляной кислотой, получены значения  $R_f$ , равные соответственно 0; 12; 23 и 43.

Меркус [43] разделял на целлюлозе MN 300 литий, натрий и калий, используя смесь метанол—10 н. соляная кислота—вода (20 : 3 : 2). Для обнаружения пятен использовался реактив Т-126. Ввиду того что Т-126 не особенно чувствителен к калию, Меркус [10] рекомендовал использовать метод Полларда [90]; после обнаружения натрия и лития указанным выше методом опрыскивали пластинку насыщенным раствором нитрата

бария с целью осаждения всех сульфатных ионов. Затем с помощью реактива Т-70 обнаруживали калий в виде серовато-черного осадка тройного Pb-Co-K нитрита, однако Т-253, по-видимому, более чувствителен к калию.

**Благородные металлы.** Джохри и сотр. [91] разделяли на силикагеле ионы  $Pd^{2+}$ ,  $Rh^{3+}$  и  $Ru^{3+}$  смесью трет-бутанол—уксусная кислота (6:1), а ионы  $Os^{8+}$ ,  $Ir^{4+}$  и  $Pt^{4+}$ —смесью трет-бутанол—уксусная кислота—соляная кислота (20:3:1). Соответствующие значения  $R_f$  равны 0,58; 0,33; 0,77; 0,08; 0,68 и 0,93. В качестве обнаруживающих реагентов для первой смеси ионов применяли Т-215 и для второй—бензидин; для обнаружения иридия пластинки подвергали действию паров соляной кислоты. Верма и Рай [92] применяли смесь амилацетат—соляная кислота (18:1) для разделения ионов платины, родия, золота, палладия и ртути, нанесенных на силикагель в виде хлоридов. Ямамото и Уно [93] разделяли на силикагеле Au ( $R_f$ 0,94), Pt ( $R_f$ 0,68), Pd ( $R_f$ 0,81) и Cu ( $R_f$ 0,0), используя в качестве растворителя ацетон. Рай и Кукрея [19] хроматографировали на силикагеле диэтилдитиокарбаматные комплексы золота, палладия и платины, а также ряда других металлов, применив в качестве растворителей бензол, толуол, ксилол и смесь хлороформ—тетрахлорид углерода (1:1).

Хашми и Адил [94] применили круговую тонкослойную хроматографию для разделения родия, золота, рутения, платины, осмия, палладия и меди смесью ацетон—ацетилацетон—2 М соляная кислота (100:10:3). Для отделения палладия использовали смесь ацетон—ацетонилацетон—вода—2 М соляная кислота (20:2:1:1). Соединения почти всех указанных элементов, за исключением родия и осмия, обнаруживали 1 %-ным раствором рубановой кислоты (рубанового водорода) в 96 %-ном этаноле; чувствительность 0,1—2,0 мкг [95]. С помощью 4 %-ного раствора тиомочевин в 2 М соляной кислоте можно обнаружить  $\geq 0,3$  мкг осмия; а с помощью раствора, содержащего 2 % хлорида олова (II) и 0,5 % хлорида калия в 4 М соляной кислоте,  $\geq 1,3$  мкг родия. Ионы  $Au^{3+}$ ,  $Se^{4+}$  и  $Te^{4+}$  можно разделить на оксиде алюминия при элюировании смесью 3 М гидроксид натрия—аммиак—вода (2:5:13); значения  $R_f$  равны 0,0; 0,52 и 0,34 соответственно [96].

Гальярди и Шамбри [97] разделяли на целлюлозе золото, платину, палладий, рутений, родий и серебро; длина слоя адсорбента должна быть не менее 40 см; элюирование проводили в две стадии: на первой (путь элюирования 17,5 см) в качестве растворителя использовали смесь метилизобутилкетон—соляная кислота—*n*-бутанол—метанол—ацетилацетон (11:6:5:2:0,5), а на второй (путь элюирования 10 см)—смесь ацетон—соляная кислота—вода—*n*-гексанол (14:2:4:2,5). Осмий отделяли от

Таблица 33.3

Величины  $R_f$  ряда неорганических ионов, полученные на очищенном силикагеле, и некоторые цветные реакции [100]<sup>а, б</sup>

Ион	$R_f \times 100$ ионов при элюировании смесями		Цветные реакции с реагентами		Чувствительность обнаружения с помощью TCNQ <sup>в</sup> , мкг
	уксусная кислота—этанол (5:95)	2 н. соляная кислота—трет-бутанол (5:95)	виолуровая кислота	Li(TCNQ) <sup>в</sup>	
Li	98		Желтая		0,5
Na	89	39	Оранжевая	Ярко-синяя	0,5
K	60	20	Красная	„	2
Rb	53	17	Красно-фиолетовая	Синяя	2
Cs	38	10	То же	Серая	20
Be	99	100 <sup>г</sup>	Желто-зеленая	Желтая	20
Mg	95	96 <sup>г</sup>	Желтая	Оливково-зеленая	20
Ca	94	93 <sup>г</sup>	Оранжевая	Серо-зеленая	50
Sr	93	15	Красно-розовая	Бледно-зеленая	50
Ba	90	0	Розовая	Синяя	25
Cu <sup>2+</sup>	80 <sup>д</sup>	95		Зеленая	0,1
Ag	89 <sup>д</sup>	38 <sup>д</sup>		Ярко-синяя	10
Zn	90	100 <sup>д</sup>		Синяя	10
Cd	100	100		„	10
Hg <sup>+</sup>	98	0		Ярко-желтая	10
Hg <sup>2+</sup>	100	97		„	40
Tl <sup>+</sup>	30 <sup>д</sup>	8	Красная	Серая	75
Pb <sup>2+</sup>	90	2	Оранжевая	Синяя	

<sup>а</sup> С разрешения автора и Amer. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

<sup>в</sup> 0,5 %-ный тетрацианохинодиметанид (TCNQ) лития в водно-этанольном (1:1) растворе.

<sup>г</sup> Очень узкая полоска.

<sup>д</sup> Образование хвостов.

Таблица 33.4

Величины  $R_f \times 100$  ионов щелочных металлов, полученные при элюировании 5 %-ным раствором уксусной кислоты в метаноле индивидуальных ионов и их смесей [100]<sup>а, б</sup>

Ион	$R_f \times 100$	
	индивидуальных ионов	ионов в смеси
Li	98	98
Na	89	89
K	60	60
Rb	5	27
Cs	38	15

<sup>а</sup> С разрешения автора и Amer. Chem. Soc.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

рутения, палладия, платины и иридия с помощью двумерного элюирования.

**Полный анализ смеси катионов.** Такитани и сотр. [98] для определения 20 распространенных ионов металлов использовали тонкие слои очищенного и затем закрепленного крахмалом силикагеля и три элюирующих растворителя. Сначала проводилось разделение Ni, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Cr и (As) путем элюирования смесью ацетон—3 н. соляная кислота (99:1). Для разделения Ba, Sr, Ca, Mg, Al, NH<sub>4</sub>, Na, K и Li использовали смесь метанол—бутанол—35 %-ная соляная кислота (8:1:1). С помощью третьего растворителя, представляющего собой смесь бутанол—бензол—1 н. азотная кислота—1 н. соляная кислота (50:46:2,6:1,4), разделяли Sb, As, (Cu), Cd, Sn, Bi, Zn и Hg. Исследовали также разделение ионов одного и того же элемента в различных валентных состояниях. Такитани и сотр. [99], сочетая аммонийносульфидный метод и тонкослойную хроматографию, изучали влияние различных анионов на идентификацию катионов. При этом установлено, что для 24 катионов чувствительность определения повышается в 10—100 раз по сравнению с методом хроматографии на бумаге.

Друдинг [100], используя слои очищенного силикагеля без закрепляющего вещества, применил две системы растворителей для разделения 18 ионов: для разделения ионов щелочных металлов—смесь уксусная кислота—95 %-ный этанол (5:95), а для разделения остальных ионов—смесь трет-бутанол—2 н. соляная кислота (95:5). В табл. 33.3 приведены величины  $R_f$  для этих

Таблица 33.5

Величины  $R_f$  некоторых токсичных неорганических ионов, полученные на целлюлозе [101]<sup>а, б</sup>

Ион	Ацетон—4 н. соляная кислота (7:3)	Ацетон—25 %-ная азотная кислота (7:3)
Ag <sup>+</sup>	50—90	30
As <sup>3+</sup>	80	40
Ba <sup>2+</sup>	0—10	10
Be <sup>2+</sup>	70	60
Bi <sup>3+</sup>	100	90
Cd <sup>2+</sup>	100	40
Ce <sup>4+</sup>	10	0
Co <sup>2+</sup>	40	30
Cu <sup>2+</sup>	80	50
Hg <sup>2+</sup>	90	90
Mn <sup>2+</sup>	30	50
Ni <sup>2+</sup>	20	30
Pb <sup>2+</sup>	70	30
SeO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	100	50
Sb <sup>3+</sup>	100	90
TeO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	30	20
Tl <sup>+</sup>	0	20
UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	90	90
Zn <sup>2+</sup>	100	30

<sup>а</sup> По данным Меркуса [101]; приведено с разрешения автора и Koninklijke Nederlandsche 'Maatschappij tot Bevordering der Pharmacie'.

<sup>б</sup> Длина пути элюирования 10 см.

ионов в обоих растворителях, а также цветные реакции этих ионов, однако следует помнить, что при хроматографировании смесей ионов величины  $R_f$  смещаются; для щелочных металлов это иллюстрируется данными табл. 33.4. Для обнаружения применяются два реагента: реагент на основе виолуровой кислоты (T-1) и реагент T-253.

Для токсикологического анализа соединений металлов Меркус [101] использовал тонкие слои целлюлозы MN 300 и два растворителя—ацетон—4 н. соляная кислота (7:3) и ацетон—25 %-ная азотная кислота (7:3). Полученные с этими растворителями величины  $R_f$  приведены в табл. 33.5. Для обнаружения пятен



применялись семь реактивов общего назначения, указаны также цветные реакции с этими реагентами, а также с 13 реагентами, специфичными для отдельных ионов.

Цетльмейсль и Хейуорт [102] составили таблицу результатов разделения на целлюлозе различных комбинаций из 21 катиона, а Каушик и Джохри [103] обобщили результаты разделения на силикагеле G 27 ионов, указав в том числе значения  $R_f$ , цветные реакции и пределы обнаружения при употреблении обнаруживающего реактива Т-215.

Хашми и сотр. [104] посредством экстракции растворителями разделили 39 катионов на пять групп. Затем четыре из этих групп хроматографировали на силикагеле методом круговой тонкослойной хроматографии, а для хроматографии пятой группы использовали оксид алюминия. Группы I ( $Fe^{3+}$ ,  $Au^{3+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $V^{5+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $Sb^{5+}$ ,  $As^{3+}$ ,  $Te^{4+}$  и  $Ge^{4+}$ ) и II ( $Pd^{2+}$ ,  $Pt^{4+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Sn^{4+}$ ) хроматографировали смесью ацетон—4 М соляная кислота—ацетилацетон (45:3:2); группу III ( $Cu^{2+}$ ,  $Ru^{3+}$ ,  $U^{6+}$ ,  $Ti^{4+}$ ,  $Zr^{4+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $La^{3+}$  и  $Al^{3+}$ ) — смесью ацетон—4 М соляная кислота (47:3); группу IV ( $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Bi^{3+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Se^{4+}$ ,  $Rh^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ ) — смесью ацетон—4 М соляная кислота—ацетилацетон (48:1,5:0,5), а группу V ( $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Th^{4+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^{2+}$  и  $Li^+$ ) — смесью ацетон—4 М соляная кислота (46:4). Группу V разделяли также на силикагеле смесью ацетон—концентрированная соляная кислота (47:3). Приведены также значения  $R_f$  и указан цвет после действия различных обнаруживающих реагентов.

Хусаин и Эйвази [105] опубликовали результаты разделения 44 катионов на неорганическом ионообменнике — арсенате олова.

### Разделение на ионообменных смолах

**Группа сероводорода.** Забин и Роллинс [106] исследовали применение неорганических соединений в качестве ионообменников для разделения катионов. Для приготовления хроматографических пластинок они использовали ортофосфат циркония и водный оксид циркония в аммиачной среде с добавкой 3 % кукурузного крахмала как закрепляющего вещества. На аммиачной форме окиси циркония можно отделить Hg ( $R_f$  0,9) от Cd ( $R_f$  0,3), группы ионов Cu, Ag, Fe, Pb ( $R_f$  0,0), каждого элемента этой группы, а также от Ni и Co (для которых  $R_f$  0,5), применяя как элюирующий растворитель 2,0 М нитрат аммония при длине пути элюирования 10 см. На водородной форме фосфата циркония при использовании 0,1 М соляной кислоты как элюирующего растворителя получены следующие значения  $R_f$ : Pb 0,0; Ag 0,0; Cu 0,1, Cd 0,4 и Hg 0,85. В этой же хроматографической системе для железа получили  $R_f$  от 0 до 0,1, а никель и кобальт давали

плохие результаты из-за образования «хвостов». При работе с обоими этими неорганическими ионообменниками проводили обнаружение пятен посредством опрыскивания аммиачным раствором сульфида аммония.

Огума [107] изучил хроматографию 39 катионов на целлюлозе ЕСТЕОЛА и на обыкновенной целлюлозе, используя как растворители метанольные растворы соляной кислоты различных концентраций, соляную кислоту и смеси уксусной и соляной кислот. Ион  $Cd^{2+}$  был отделен от различных смесей с 38 другими ионами. Курода и сотр. [108] хроматографировали ионы  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Hg^{2+}$  на DEAE-целлюлозе, элюируя смесью водного раствора азиды натрия с соляной кислотой и смесью водного раствора азиды, соляной кислоты и метанола. Исследование охватывало также переходные металлы. Фраш и Дадон [109] исследовали хроматографические характеристики  $Pb^{2+}$ ,  $Bi^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Sb^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  и  $Hg^{2+}$  при разделении на анионообменной смоле амберлит CG400 и на катионообменной смоле амберлит CG120, применив как элюирующие растворители соляную кислоту в различных концентрациях и азотную кислоту в различных концентрациях [110]. Шимизу и сотр. [111] изучали ту же группу ионов, кроме  $Sn^{4+}$ , проводив элюирование серной кислотой и кислотными растворами сульфата аммония на слоях карбоксиметилцеллюлозы; приведены значения  $R_f$  ряда многокомпонентных смесей. Лепри и Дезидери [112] определяли значения  $R_f$  ртути(II), меди(II), кадмия(II) и ртути(I) на карбоксиметилцеллюлозе (в натриевой форме) и на дауэксе 50-Х4 ( $Na^+$ ) в присутствии различных концентраций ацетатного, лактатного и оксалатного буферных растворов, а также в нейтральных растворах одно- и двухзарядных ионов и в щелочных растворах однозарядных ионов [113].

**Группа сульфида аммония.** Бергер и сотр. [114] использовали для разделения  $Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$  двухслойную пластинку. Узкая полоска пластинки была покрыта смесью (3 г целлюлозы MN 300+0,1 г диметилглиоксима в 35 мл воды); остальная часть — смесью (30 г дауэкса 50 WX 2 в аммонийной форме + 5 г целлюлозы + 60 мл воды). После высушивания пластинки пробу наносили на ту ее часть, которая содержала диметилглиоксим, и элюировали эту пробу водно-этанольным (70:20) раствором, содержащим 5 г винной кислоты и нейтрализованным аммиаком до определенной степени аммиачного запаха. В этой системе никель образует комплекс с диметилглиоксимом, который остается на старте (в месте нанесения пробы). Часть кобальта задерживается на границе слоев, а остальная часть последовательно распределяется на несколько пятен. Вероятно, эти пятна представляют собой комплексы типа аммиакатов кобальта, так как их можно распознать по цвету после опрыскива-

ния водным раствором сульфида натрия. Железо движется вместе с фронтом растворителя, вероятно, в виде виннокислого комплекса.

Проводились работы по хроматографированию различных представителей этой группы на целлюлозе ЕСТЕОЛА [107], амберлите CG 400, амберлите CG 120 [109, 110], карбоксиметилцеллюлозе [111], карбоксиметилцеллюлозе (в натриевой форме) и дауэксе 50-X4 ( $\text{Na}^+$ ) [112, 113] с применением растворителей, упомянутых выше в разд. «Группа сероводорода».

**Редкоземельные элементы.** Лантаноиды подвергали хроматографическому разделению на карбоксиметилцеллюлозе (в натриевой форме) и дауэксе 50-X4 ( $\text{Na}^+$ ) при элюировании лактатными буферными растворами [115]. Шимизу и Муго [116] хроматографировали на DEAE-целлюлозе трехвалентные редкоземельные элементы, а также цирконий, гафний, торий и уран, элюируя смесью 0,1 М серная кислота—0,05 М сульфат аммония; указанные катионы можно полностью разделить при двумерном элюировании, используя этот растворитель для элюирования в первом направлении и смесь 0,1 М серная кислота—1 М сульфат аммония для элюирования во втором направлении. Ишида [117] исследовал хроматографические характеристики редкоземельных элементов на DEAE-целлюлозе при элюировании смесью метанол—азотная кислота. Для разделений в ряду катионов лантан—неодим наиболее эффективными являются смеси метанол—8 н. азотная кислота (5:1) и метанол—1 н. азотная кислота (20:1). Катионы самария, европия и гадолиния разделялись при элюировании смесью метанол—14 н. азотная кислота (20:1).

**Щелочноземельные элементы.** Бергер и сотр. [114, 118] применяли дауэкс 50 WX 2 ( $\text{H}^+$ ) для отделения бария, кальция и цезия. Слои закреплялись целлюлозой, как описано выше, в разделе «Группа сульфида аммония», и для отделения проводилось элюирование 0,75 М лактатом аммония. Таким образом, удалось разделить радиоактивные изотопы  $^{45}\text{Ca}$ ,  $^{89}\text{Sr}$  и  $^{131}\text{Ba}$ , а также отделить их от продукта превращения  $^{131}\text{Cs}$ , который двигался вместе с фронтом растворителя.

Катионы этой группы хроматографировали на целлюлозе ЕСТЕОЛА [107], амберлите CG 400 и амберлите CG 120 [109, 110], карбоксиметилцеллюлозе [111], карбоксиметилцеллюлозе (в натриевой форме) и дауэксе 50-X4 ( $\text{Na}^+$ ) [112, 113] растворителями, упомянутыми выше в разделе «Группа сероводорода». Бергер и сотр. [119] использовали двухслойную пластинку из анионита дауэкс 1-X10 и катионита хелакс 100 (Bio-Rad) для того, чтобы за одно хроматографирование разделить катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$ , а также анионы  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$  и  $\text{Cl}^-$ , используя как растворитель 2 М нитрат аммония.

**Группа щелочных металлов.** Для разделения щелочных металлов Бергер и сотр. [114] использовали смесь адсорбентов дауэкс 50 ( $\text{H}^+$ )—целлюлоза (30:5). При элюировании 1 М хлоридом лития можно разделить барий, цезий и натрий, а также отделить их от рубидия и калия (последняя пара не разделяется при этих условиях). Радиоактивность пятен измеряли счетчиком Гейгера—Мюллера.

Однако калий и рубидий легко разделяются на неорганическом ионообменнике. Лезиганг [120] исследовал применение неорганических ионообменников для разделения изотопов щелочных металлов. В числе исследованных веществ были: фосфододекамолибдат аммония (APM), арсенододекамолибдат аммония (AAM), германодекамолибдат аммония (AGM) и оксингерманодекамолибдат (OGM). Слои адсорбента не содержали закрепляющего вещества; сначала из кристаллического ионообменника и ацетона (или водно-ацетонового раствора) готовили жидкую кашицу, которую наносили на пластинки; пластинки сушили на воздухе в течение 24 ч. Например, для APM, синтезированного по методу Смита и сотр. [121], для приготовления кашицы брали водно-ацетоновый (1:9) раствор; при нанесении на пластинку старались, чтобы на ней получился слой, соответствующий поверхностной плотности  $\sim 10\text{--}12$  мг/см<sup>2</sup>. Ионы  $^{22}\text{Na}$ ,  $^{42}\text{K}$ ,  $^{86}\text{Rb}$  и  $^{137}\text{Cs}$  наносили на хроматографическую пластинку и элюировали в растворах нитрата аммония различных концентраций (табл. 33 б). Наиболее эффективное разделение щелочных элементов достигнуто при использовании APM и 5,0 М нитрата аммония; однако разделение рубидия и цезия еще более улучшалось, если применялся 10 М раствор той же соли. Можно прийти к отличному отделению цезия от остальных трех ионов, если работать с 0,1 М нитратом аммония на слоях OGM. В этой хроматографической системе цезий совсем не перемещался, в то время как остальные три иона характеризуются высокими значениями  $R_f$ . Положение пятен соединений обнаруживали с помощью счетчика Гейгера—Мюллера, окошко которого закрыто алюминиевой фольгой с пятимиллиметровой щелью. Лезиганг и Хехт [122] испытывали также другие гетерополикислоты.

Кавамура и сотр. [123] получили хорошее разделение натрия, калия, рубидия и цезия на смеси ферроцианид цинка—целлюлоза (1:10) при элюировании 0,2 М нитратом аммония. Бергер [119] использовал двухслойный адсорбент из дауэкса 1-X10 ( $\text{OH}^-$ ) и дауэкса 50-WX2 ( $\text{H}^+$ ) и 1 М нитрат лития в качестве растворителя для разделения как катионов, так и анионов смеси иодид натрия, бромид калия и хлорид цезия.

**Разные катионы.** DEAE-целлюлоза, представляющая собой слабоосновной анионообменник, также исследовалась как адсорбент для разделения катионов. Курода и сотрудики

Таблица 336

Величины  $R_f \times 100$  щелочных металлов, полученные на неорганических ионообменниках при различных концентрациях нитрата аммония [120]<sup>a</sup>

Адсорбент для ТСХ <sup>б</sup>	Концентрация $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (элюирующего растворителя), моль/л	$R_f \times 100^B$			
		<sup>22</sup> Na	<sup>42</sup> K	<sup>86</sup> Rb	<sup>137</sup> Cs
APM	0,1	80	21	14	14
	1,0	90	42	20	16
	5,0	96	72	24	20
	10,0	100	100	40	20
AAM	0,1	60	18	14	16
	1,0	80	25	20	20
AGM	0,1	50	20	0	0
	1,0	70	30	14	14
OGM	0,1	94	90	92	0
	1,0	100	100	100	96

<sup>a</sup> С разрешения авторов и Springer-Verlag.

<sup>б</sup> APM — фосфододекамолибдат аммония; AAM — арсенододекамолибдат аммония; AGM — германодекамолибдат аммония; OGM — оксингерманодекамолибдат аммония.

<sup>B</sup> Длина пути элюирования 10 см.

определяли хроматографические характеристики 48 катионов при разделении на этом ионообменнике следующими растворителями: бинарными смесями, состоявшими из серной кислоты различной концентрации и органического растворителя — ацетона, диоксиана или уксусной кислоты [124], смесями родонистоводородной кислоты с органическими растворителями [125] и фосфорной кислоты различной концентрации [126]. В другой работе [127] устанавливалась зависимость между значениями  $R_f$  52 катионов и концентрациями соляной кислоты в смесях соляная кислота—органический растворитель (1 : 20).

Электрофорез. Пфрундер и сотр. [128] исследовали разделение неорганических ионов на тонких слоях агар-агара при напряжении 120 В. Разделение кобальта, никеля, меди и железа занимало от 10 до 12 мин, а подвижность этих ионов уменьшалась в порядке их перечисления. Для обнаружения разделенных

соединений промывали тонкие слои агара дистиллированной водой и затем в течение 20 мин подвергали воздействию паров аммиака, после чего погружали их на 5 мин в 1 %-ный спиртовой раствор дитиооксиамида. Этим же методом при напряжении 110 В за 10 мин разделены ионы  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$ . После промывки и обработки слоев газообразным аммиаком обнаруживали эти ионы 1 %-ным этанольным раствором дифенилкарбазида; обнаружение показало, что ртуть оставалась на старте, а свинец и кадмий хорошо разделялись, причем последний характеризуется большей подвижностью. При разделении хрома, марганца и никеля в присутствии большого избытка ионов трехвалентного железа обнаружено, что железо диффундирует вдоль пути элюирования и смешивается с другими ионами. Эту трудность разрешили посредством приготовления слоев агара, которые содержали буферный раствор состава: 2 М гидроксид аммония + 2 М хлорид аммония + вода (1 : 9 : 190). Слой пропитывали этим буферным раствором и наносили пробу в центре пластинки. После наложения напряжения 80 В в течение 20 мин обнаружили, что никель и железо переместились к катоду, причем никель характеризуется большей подвижностью, а хром и марганец продвинулись к аноду (хром двигался быстрее, чем марганец). В этом случае в качестве обнаруживающего реагента для никеля и железа использовали 1 %-ный раствор диметилглиоксима в этаноле, окрашивающий пятна в коричневый и красный цвета соответственно; затем после дальнейшей обработки газообразным аммиаком и опрыскивания 0,5 %-ным раствором бензидина в 10 %-ной уксусной кислоте пятно марганца сразу синело и становилось видимым, в то время как пятно хрома (тоже синее) появлялось лишь спустя некоторое время.

Могисси [129] применил электрофорез с высоким напряжением (45 В/см) для разделения катионов. Он использовал аппаратуру двух видов: одну камеру, охлаждаемую водой, и другую камеру, где разделение велось в атмосфере водяного пара при температуре 90°C. При использовании в качестве электролита 0,5 М молочной кислоты ионы продвигались на следующие расстояния (в миллиметрах):  $\text{Fe}^{3+}$  45,  $\text{Zr}^{4+}$  0,  $\text{Nb}^{5+}$  40,  $\text{Pt}^{4+}$  0 и 15,  $\text{Hf}^{4+}$  50 (с образованием «хвоста»),  $\text{Co}^{2+}$  75,  $\text{Ni}^{2+}$  70,  $\text{Ba}^{2+}$  65,  $\text{Pb}^{2+}$  0,  $\text{Ga}^{2+}$  55,  $\text{Sr}^{2+}$  20,  $\text{Ce}^{3+}$  60,  $\text{La}^{3+}$  50,  $\text{Y}^{3+}$  60 (с образованием хвоста),  $\text{Pd}^{2+}$  35,  $\text{W}^{6+}$  55 (с образованием «хвоста»),  $\text{Cd}^{2+}$  75,  $\text{Sc}^{3+}$  40,  $\text{Bi}^{5+}$  55 (с образованием «хвоста»),  $\text{Zn}^{2+}$  85 (с образованием «хвоста»),  $\text{Rh}^{3+}$  45,  $\text{Ir}^{4+}$  50,  $\text{Ru}^{3+}$  62,  $\text{Tl}^{+}$  58,  $\text{Ag}^{+}$  90,  $\text{Sn}^{2+}$  75,  $\text{Ti}^{4+}$  25,  $\text{Cu}^{2+}$  65,  $\text{Be}^{2+}$  58,  $\text{Sb}^{3+}$  60,  $\text{Al}^{3+}$  50,  $\text{Li}^{+}$  65 и  $\text{Mg}^{2+}$  70 мм. Во всех случаях разделение длилось 5 мин.

Такитани и др. [130] применяли напряжение 1200 В на участке 30 см при разделении на слоях закрепленного крахмалом

силикагеля с использованием в качестве электролита раствора лимонной кислоты. Таким образом разделены следующие ионы:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{4+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Hg}^{2+}$ . Бухтела и Лезиганг-Бухтела [131] указали расстояния, на которые мигрировали 32 иона металлов при электрофорезе на целлюлозе в течение 20 мин при напряженности поля 50 В/см и токе 5 и 15 мА с подвижным растворителем 0,1 М 2-окси-2-метилпропионовая кислота при рН 2,72; 4,0; 6,0 и 8,8.

При электрофорезе некоторых редкоземельных катионов [132, 133], а также катионов из группы сероводорода [134] применяли в качестве электролита EDTA.

Ван Оой и Хоутман [135] разделяли соединения радиоактивного иридия комбинированным методом: в одном направлении они проводили электрофорез на тонком слое, а в другом — тонкослойное хроматографирование.

## 2. АНИОНЫ

### Фосфаты

Поскольку сульфат кальция вступает в реакцию с фосфатами, образуя нерастворимые фосфаты кальция, Зейлер [136] использовал для разделения анионов вторичного пирофосфата, первичного ортофосфата, первичного ортофосфата и первичного гипофосфата слои очищенного силикагеля, закрепленные крахмалом. После испытания многих растворителей, как кислотных, так и щелочных, выбрана смесь метанол—гидроксид аммония—10 %-ная трихлоруксусная кислота—вода (10:3:1:6), которая оказалась наиболее эффективной при длине элюирования 10 см. После элюирования пластинки сушили, а потом опрыскивали сначала 1 %-ным раствором молибдата аммония, а затем 1 %-ным раствором хлорида олова в 10 %-ной соляной кислоте. В результате эти ионы обнаруживались в виде синих пятен (гипофосфит — только через некоторое время). Разделение ионов соответствовало следующему порядку (уменьшения) значений  $R_f$ :  $\text{H}_2\text{PO}_2 > \text{H}_2\text{PO}_3 > \text{H}_2\text{PO}_4 > \text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

Пилсон и Фрагала [137] разделяли на целлюлозе ЕСТЕОЛА ионы силикагеля и фосфата, элюируя смесью изопропанол—вода—уксусная кислота (20:5:2). Фосфат обнаруживали с помощью реактива Т-19, а силикат с помощью реактива Т-18.

Рессель [138] исследовал ряд различных адсорбентов для разделения группы конденсированных фосфатов и избрал порошок целлюлозы 140 и 142 dg (фирмы Schleicher und Schuell), дважды промытые кислотой. В качестве закрепляющего вещества применялся кукурузный крахмал, так как эти порошки

целлюлозы сами не прилипали достаточно прочно к пластинке. Среди других адсорбентов, подвергнутых исследованию, были не только силикагель G и силикагель Woelm без связующего, но также шесть других порошков целлюлозы, изготовленных разными фирмами. Использовались также пять различных смесей растворителей. Значения  $R_f$  для конденсированных фосфатов приведены в табл. 33.7. Для разделения моно-, ди-, три-, тримета-, тетрамета- и полифосфатов применялась также двумерная хроматография. При этом элюирование в первом направлении проводили растворителем А (см. табл. 33.7), а элюирование во втором направлений — смесью 67,5 мл метанола, 22,6 мл раствора изопропанола в воде (700 мл изопропанола на 100 мл воды), 50 мл раствора трихлоруксусной кислоты в 25 %-ном аммиаке (75 г кислоты на 80 мл аммиака) разбавленных до 1000 мл водой), 6 мл уксусной кислоты (200 мл 96 %-ной кислоты на 800 мл воды). Такая же методика применялась для разделения смеси линейных конденсированных фосфатов и циклических конденсированных фосфатов. При этом получены пятна тримета-, тетрамета-, пентамета-, гексамета- и гептаметафосфатов.

После разделения для обнаружения высушенные пластинки опрыскивали раствором, приготовленным следующим образом: 40 г дигидрата молибдата натрия и 50 г нитрата аммония растворяли в воде и доводили его объем до 1000 мл; полученный раствор вливали в 100 мл концентрированной азотной кислоты ( $d_{20} 1,40$ ). Затем пластинки вновь сушили и опрыскивали профильтрованным раствором восстановителя: 300 г пиросульфата натрия, 10 г сульфита натрия и 2 г метола на 1000 мл воды [138].

Оранж и др. [139] также использовали тонкие слои целлюлозы для разделения конденсированных фосфатов. Для последующего элюирования кислотными растворителями исходную целлюлозу MN 300 последовательно промывали соляной кислотой и 8-оксихинолином, а затем этанолом и дистиллированной водой до рН 7. После такой подготовки пластинок их подвергали предварительному элюированию трихлоруксусной кислотой с целью отодвинуть оставшиеся примеси в верх пластинки. Если по методике необходимо элюирование щелочными растворителями, исходную целлюлозу промывали спиртом, затем трихлоруксусной кислотой, которую отмывали дистиллированной водой, доводя рН элюата до 7. При использовании многокомпонентных систем растворителей исследовали влияние изменения соотношения компонентов на разделение. В табл. 33.7 приведены значения  $R_f$  для наиболее эффективного кислотного и наиболее эффективного щелочного растворителей. Проводили также двумерное хроматографирование, элюируя в одном направлении

Таблица 33.7

Величины  $R_f \times 100$  конденсированных фосфатов, полученные на тонких слоях целлюлозы с различными растворителями <sup>а</sup>

Фосфат	Целлюлоза 140 dg (Schleicher und Schuell) <sup>б</sup> [138]		Целлюлоза 142 dg (Schleicher und Schuell) <sup>б</sup> [138]		Очищенная целлюлоза MN 300 <sup>в</sup> [139]	
	А	Б	Б	В	Г	Д
Моно-	84	84	83	55	55	34
Ди-	75	64	67	72	40	15
Три-	60	46	45	58	31	15
Тетра-	46	30	30	45	22	
Пента-	33	18	20	30	16	
Гекса-	23		12	19	11	
Гепта-	16		7	11	7	
Окта-	10		4	6	5	
Тримета-	45	19	17	34		6
Тетрамета-	24	10	19	18		47
Пентамета-			5	12		
Гексамета-				8		
Гептамета-				5		

<sup>а</sup> Растворители: А — 60 мл метанола, 30 мл диоксана, 30 мл раствора изопропанол—вода (7:1), 8 мл раствора уксусной кислоты (96 %-ная уксусная кислота: вода=1:4), 40 мл раствора трихлоруксусной кислоты (125 г кислоты, 35 мл 25 %-ного аммиака, вода до объема 1000 мл); Б — 70 мл диоксана, 30 мл раствора трихлоруксусной кислоты (160 г кислоты, 8 мл 25 %-ного аммиака, вода до 1000 мл); В — 75 мл метанола, 20 мл раствора изопропанола (см. выше), 25 мл раствора трихлоруксусной кислоты (125 г кислоты, 32 мл 25 %-ного аммиака (вода 1000 мл), 6 мл раствора уксусной кислоты (96 %-ная уксусная кислота: вода=1:4)); Г — 30 мл воды, 35 мл этанола, 15 мл изобутанола, 20 мл изопропанола, 0,4 мл аммиака (22° Боме), 5 г трихлоруксусной кислоты; Д — 9 мл аммиака (22° Боме), 50 мл метанола, 10 мл изобутанола, 31 мл воды, 0,3 мл муравьиной кислоты.

<sup>б</sup> Длительность элюирования 60 мин; длина пути элюирования ~ 16 см.

<sup>в</sup> Методику очистки см. в тексте. Длина пути элюирования 14 см.

кислотным растворителем, а во втором направлении — основным растворителем.

Клесери и Ли [140] разделили на слоях целлюлозы ортофосфат- и пирофосфат-ионы, используя как растворитель смесь диоксан—вода—гидроксид аммония—трихлоруксусная кислота (65 мл—27,5 мл—0,25 мл—5 г). Полученные значения  $R_f$  равны соответственно 0,83 и 0,61. Баудлер и Штульман [141] и Баудлер и Менгель [142, 143] разделили моно-, ди- и трифосфорные кислоты на слоях целлюлозы MN 2300, используя как растворители различные смеси метанола, гидроксида аммония, уксусной кислоты, воды и ацетона или этанола. Ковелло и Скеттино [144] применяли фотоденситометрический метод для определения содержания полифосфатов в пищевых продуктах после того, как эти полифосфаты были разделены посредством тонкослойной хроматографии.

### Галогениды

Зейлер и Каффенбергер [145] использовали растворы солей щелочных металлов для разделения анионов на очищенных слоях силикагеля G смесью ацетон—*n*-бутанол—гидроксид аммония—вода (13:4:2:1). После нанесения в виде солей щелочных металлов эти анионы продвигались по слою как соли аммония, причем фтор-ион оставался на линии старта. Оставшиеся ионы располагались следующим образом (в порядке возрастания  $R_f$ ): хлор, бром и иод. Их положение на хроматограммах определяли опрыскиванием 0,1 %-ным раствором бромкрезолового пурпурного в этаноле, причем раствор этого индикатора доводился до точки обращения разбавленным аммиаком. Для обнаружения пятен использовались также в сочетании 1 %-ный аммиачный раствор нитрата серебра и 0,1 %-ный этанольный раствор флуоресцеина. Ион фтора, не обнаруживаемый ни одним из этих реагентов, можно обнаружить 0,1 %-ным раствором ализаринциркониевого лака в крепкой соляной кислоте.

Тустановский [146] разделял  $Cl^-$ ,  $Br^-$  и  $I^-$  на оксиде алюминия при элюировании 0,2 М нитратом калия. Петрович и Цанич [147] использовали слой маисового крахмала для разделения ионов  $Cl^-$  ( $R_f$  0,40),  $Br^-$  ( $R_f$  0,60),  $I^-$  ( $R_f$  0,78) и  $F^-$  ( $R_f$  0,04) смесью ацетон—3 н. раствор аммиака (7:3). Можно также разделить эти четыре иона на микрокристаллической целлюлозе смесью ацетон—вода (4:1) или ацетон—этилацетат—вода (3:1:1) [148].

Бергер и др. [114, 118, 149] применили анионообменную смолу дауэкс 1X2 для разделения ионов хлора, брома и иода. Для приготовления адсорбционных слоев смешивали 30 г смолы (фракция 100—200 меш) с 5 г целлюлозы MN 300 и

60 мл воды. Целлюлоза выполняла функцию закрепляющего вещества, удерживающего смолу на хроматографической пластинке. Применялась смола в форме  $\text{OH}^-$  или  $\text{Cl}^-$ , а элюирующим растворителем служил 1 М нитрат натрия. Ионы радиоактивных изотопов после разделения обнаруживали с помощью сцинтилляционного счетчика. Порядок зон, занятых данными ионами (по значениям  $R_f$ ), на ионообменной смоле соответствовал следующему:  $\text{I}^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^-$ , т. е. был обратный тому, который получался на силикагеле.

Муто [150, 151] применил тонкослойную осадительную хроматографию для разделения хлорида, бромиды, иодида кальция, а также фосфата кальция. Слой силикагеля обрабатывался 3 %-ным водным раствором нитрата серебра, а растворителем для элюирования служила смесь насыщенная изобутанолом вода—40 %-ный раствор ацетата аммония (4:1).

### Другие анионы

Зейлер и Эрленмейер [152] использовали тонкие слои закрепленного крахмалом силикагеля (MN-Kieselgel S-HR) для разделения и идентификации некоторых серных оксокислот и некоторых полиотионовых кислот в виде их солей со щелочными металлами. Оксокислоты лучше всего разделялись смесью метанол—1-пропанол—гидроксид аммония—вода (10:10:1:2), а полиотионаты—смесью метанол—диоксан—гидроксид аммония—вода (3:6:1:1). В качестве обнаруживающих реагентов использовали аммиачный раствор нитрата серебра и бромкрезоловый зеленый. Ханда и Джохри [153] разделили анионы  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  на микрокристаллической целлюлозе. Пробы натриевых солей (предварительно высушенные) наносили на слой в виде растворов в 1 %-ном ацетате цинка, а затем элюировали смесью *n*-пропанол—1 М раствор аммиака—ацетон (15:10:1). Значения  $R_f$  равны соответственно 0,0; 0,70; 0,28 и 0,51. Количественные результаты получали с помощью кольцевой колориметрии.

Анионы хлората ( $R_f$  0,82), перхлората ( $R_f$  0,97), бромата ( $R_f$  0,53), иодата ( $R_f$  0,06) и периодата ( $R_f$  0,06) хроматографировали на маисовом крахмале [147] смесью ацетон—3 н. аммиак (7:3). Ионы иодата, периодата, а также иодида можно разделить на силикагеле смесью метанол—25 %-ный аммиак—вода—10 %-ная уксусная кислота (18:2:2:1) [154]. Ледерер и Синибалди [155] получили для пербромата, бромата, периодата и иодата значения  $R_f$  0,67; 0,27; 0,10 и 0,07 соответственно. Они использовали слои целлюлозы, нанесенные на алюминиевую фольгу и смесь бутанол—пиридин—1 н. аммиак (2:1:2). Пешке [156] разделял ионы перхлората, хлората, хлорита, бро-

мата, бромита и иодата на слоях из смеси оксид алюминия—силикагель (1:1), элюируя смесью *n*-бутанол—ацетон—аммиак—вода (8:10:2:1).

Фипс [157] разделял ионы перрената, молибдата и селенита на пластинках с силикагелем хромаграм, элюируя смесями азотная кислота—метанол—вода в различных соотношениях. На слоях силикагеля, нанесенных на стеклянные пластинки, не удалось получить достаточно хорошее разделение, потому что ион молибдата попадал очень близко к иону перрената. Джохри и др. [158] разделяли на силикагеле ионы молибдата, селенита, теллурида и ванадата смесью *n*-бутилацетат—соляная кислота (40:0,6). Ионы селенита и молибдата лучше разделялись между собой при элюировании смесью диэтилоксалат—соляная кислота (60:1).

Могисси [71] определил для ряда анионов значения  $R_f$  на слоях оксида лантана, закрепленных крахмалом. Соответствующие значения  $R_f$ , полученные с двумя растворителями, приведены в табл. 33.8. Иодид, иодат и теллурид разделяли на слоях силикагеля, очищенного по методу Зейлеров [2]. Наиболее эффективным растворителем была смесь ацетон—6 н. аммиак (1:1), с которой получены значения  $R_f$ , равные соответственно 0,9; 0,4 и 0,1.

Сеховский [159] применил тонкослойную хроматографию на слоях силикагеля для количественного определения хромовой кислоты, используя метод измерения площади пятен, дававший стандартное отклонение  $\pm 6\%$ . Элюирующим растворителем была смесь метанол—вода (8:2). При низких концентрациях хромовой кислоты можно было в десять раз уменьшить предел обнаружения, производя опрыскивание 1 %-ным раствором дифенилкарбазида в ацетоне, благодаря чему пятна окрашивались в фиолетовый цвет.

**Разделение электрофорезом.** Добици и Грассини [160] разделяли ионы периодата и иодата на тонких слоях алебаstra. Слой алебаstra насыщали 0,05 М раствором карбоната аммония, служившим электролитом, и проводили разделение при напряжении 300—400 В в течение 1,5—2 ч. Разделение было гораздо лучшим, чем при электрофорезе на бумаге. Могисси [129] использовал для электрофоретического разделения анионов слои силикагеля или кизельгура. Он применял как низковольтную, так и высоковольтную аппаратуру, но опубликовал только данные, полученные на высоковольтном приборе. Для разделения анионов использовался в качестве электролита 0,1 н. гидроксид натрия, и при продолжительности разделения 2 мин и напряженности поля 45 В/см получились следующие длины путей миграции (в миллиметрах):  $\text{SCN}^-$  35;  $\text{SeO}_3^{2-}$  30 (образование

Таблица 33.8

Величины  $R_f \times 100$  различных анионов, полученные на слоях закрепленного крахмалом оксида лантана [71]<sup>a</sup>

Ион	1 н. гидроксид аммония	1 н. гидроксид аммония—ацетон (1:1)
$\text{SO}_4^{2-}$	100	60 <sup>b</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$	0	0
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	100	45
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	100	90
$\text{MnO}_4^-$	0	0
$\text{SCN}^-$	100 <sup>b</sup>	90
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	80	35 <sup>b</sup>
$\text{IO}_3^-$	85	45
$\text{I}^-$	95	90
$\text{Br}^-$		90
$\text{Cl}^-$		100
$\text{SO}_3^{2-}$	100	80
$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$	100	60
$\text{SeO}_3^{2-}$	75	30
$\text{TeO}_3^{2-}$	0	0
$\text{MoO}_4^{2-}$	90	60
$\text{NO}_2^-$	90	85
$\text{NO}_3^-$	90	90

<sup>a</sup> С разрешения автора и Elsevier Publishing Co.

<sup>b</sup> Образование «хвостов».

«хвоста»):  $\text{FeO}_3^{2-}$  22 (образование «хвоста»);  $\text{I}^-$  60;  $\text{IO}_3^-$  51;  $\text{Cl}^-$  55;  $\text{ClO}_3^-$  53;  $\text{Br}^-$  60;  $\text{BrO}_3^-$  45;  $\text{NO}_3^-$  58;  $\text{NO}_2^-$  55;  $\text{SO}_4^{2-}$  56 и  $\text{PO}_4^{3-}$ . Для обнаружения пятен применялись радиоактивные изотопы.

**Полный анализ смеси анионов.** Каванабе и сотр. [161, 162] применили для полного анализа анионов тонкослойную хроматографию на очищенном силикагеле, закрепленном добавкой 5% крахмала. Анионы группы А ( $\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{IO}_3^-$  и  $\text{NO}_3^-$ ) разделяли смесью ацетон—вода (10:1). Группу В ( $\text{F}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$  и  $\text{AsO}_3^{3-}$ ) хроматографировали смесью метанол—бутанол—вода (3:1:1), а группу В ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  и  $\text{VO}_2^{2-}$ ) элюировали бутанолом, уравновешенным 2 н. азотной кислотой.

Хашми и др. [104] опубликовали значения  $R_f$ , цветные реакции и пределы обнаружения для 19 анионов, разделенных методом круговой тонкослойной хроматографии главным образом на слоях оксида алюминия; причем элюирование производилось верхней фазой смеси *n*-бутанол—пиридин—вода—аммиак (8:4:8:1). Хашми и Чугтаи [163] хроматографировали на силикагеле и на оксиде алюминия анионы хромата, флорида, бромида, иодида, бромата, хлората, феррицианида, ферроцианида, роданида, арсенита и сульфита, применив тонкослойную круговую хроматографию с различными растворителями, в числе которых были смесь бутанол—вода—пиридин (2:2:1), а также ацетон. Цанич и сотр. [164] разделили на мансовом крахмале анионы  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{BO}_3^{3-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , элюируя смесью ацетон—3 М аммиак (1:1).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949).
2. Seiler H., Seiler M., Helv. Chim. Acta, 43, 1939 (1960).
3. Seiler H., Helv. Chim. Acta, 45, 381 (1962).
4. Merkus F. W. H. M., "Kwalitatieve Analyse van Kationen met Behulp van Dunnelaagchromatografie", Thesis, Amsterdam, 1966.
5. Lederer M., Chromatogr. Rev., 9, 115 (1967).
6. Lesigang-Buchtela M., Oesterr. Chem. Ztg., 67, 115 (1966).
7. Вольнец М. П., Ермаков А. Н., Усп. хим., 39, 934 (1970).
8. Garel J.-P., Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 1899.
9. Takitani S., Kawanabe K., Kagaku No Ryoiki, Zokan, No 64, 221 (1964); Chem. Abstr. 62, 10800c (1965).

10. Merkus F. W. H. M., "Progress in Inorganic Thin-Layer Chromatography", in "Progress in Separation and Purification", Vol. 3, E. S. Perry, C. J. Van Oss, Eds., Wiley-Interscience, 1970, p. 234.
11. Fishbein L., Chromatogr. Rev., 15, 195 (1971).
- 11a. Brinkman U. A. T., de Vries G., J. Chromatogr., 85, 187 (1973).
12. Kuenzi R., Dissertation, Basel University, 1962.
13. Kuenzi P., Baeumler J., Obersteg J. I., Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med., 52, 605 (1962).
14. Johri K. N., Kaushik N. K., Indian J. Appl. Chem., 33, 173 (1970).
15. Johri K. N., Mehra H. C., Chromatographia, 4, 80 (1971).
16. Baffi F., Dadone A., Frache R., Chromatographia, 9, 280 (1976).
17. Rai J., Kukreja V. P., Chromatographia, 2, 404 (1969).
18. Oguma K., Talanta, 14, 685 (1967).
19. Rai J., Kukreja V. P., Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., Lect. Pap., 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 453.
20. Senf H.-J., J. Chromatogr., 21, 363 (1966).
21. Schwedt G., Lippmann C., Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 70, 204 (1974).
22. Hranisavljević-Jakovljević M., Pejković-Tadić I., Jakovljević K., "Thin-Layer Chromatography of Inorganic Ions" in "Thin-Layer Chromatography", G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 221.
23. Tewari S. N., Bhatt N., Chromatographia, 5, 624 (1972).
24. Gregorowicz Z., Kulicka J., Suwinska T., Chem. Anal. (Warsaw), 16, 169 (1971).
25. Baudot P., Monal J. L., Livertoux M. H., Truhaut R., J. Chromatogr., 128, 141 (1976).
26. Tsunoda Y., Takeuchi T., Yoshino Y., Nippon Kagaku Zasshi, 85, 275 (1964).
27. Tsunoda Y., Takeuchi T., Yoshino Y., Nippon Kagaku Zasshi, 85, 103 (1964).
28. Tsunoda Y., Takeuchi T., Yoshino Y., Sci. Papers Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo, 14, 63 (1964); Chem. Abstr., 61, 15325 (1964).
29. Masoomi Z., Haworth D. T., J. Chromatogr., 48, 581 (1970).
30. Vanderdeelen J., J. Chromatogr., 39, 521 (1969).
31. Verma M. R., Rai J., Int. Symp. Chromatogr., Electrophoresis, 4th, 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 544.
32. Seiler H., Seiler M., Helv. Chim. Acta, 44, 939 (1961).
33. Lesigang-Buchtela M., Buchtela K., Microchim. Acta, 1967, 670.
34. Hu C.-T., K'o Hsueh Tung Pao, 1963, 63; Chem. Abstr., 60, 4757 (1964).
35. Phipps A. M., Anal. Chem., 43, 467 (1971).
36. Гайбакян Д. С., Бабалян Х. С.; Завод. лаб., 37, 9 (1971).
37. Soljić Z., Marjanović V., Z. Anal. Chem., 242, 245 (1968).
38. Soljić Z., Turina S., Marjanović V., Microchim. Acta, 1969, 894.
39. Gagliardi E., Brodar B., Chromatographia, 2, 267 (1969).
40. Zayz D. F., Frei R. W., Frodyma M. M., Anal. Chim. Acta, 39, 13 (1967).
41. Miketuková V., Frei R. W., J. Chromatogr., 47, 427 (1970).
42. Buchbauer G., Sci. Pharm., 40, 190 (1972).
43. Merkus F. W. H. M., Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., 5th, 1968, Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1969, p. 72.
44. Lesigang-Buchtela M., Microchim. Acta, 1966, 408.
45. Lesigang-Buchtela M., Buchtela K., Microchim. Acta, 1967, 570.
46. Markl P., Hecht F., Microchim. Acta, 1963, 889.
47. Markl P., Hecht F., Microchim. Acta, 1963, 940.
48. Cerrai E., Testa C., J. Chromatogr., 5, 442 (1961).
49. Testa C., J. Chromatogr., 5, 236 (1961).
50. Graham R. J. T., Bark L. S., Tinsley D. A., J. Chromatogr., 35, 416 (1968).
51. McCormick D., Graham R. J. T., Bark L. S., Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., 4th, 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 199.
52. Graham R. J. T., Bark L. S., Tinsley D. A., J. Chromatogr., 39, 200 (1969).
53. Graham R. J. T., Carr A., J. Chromatogr., 46, 293 (1970).
54. Graham R. J. T., Carr A., J. Chromatogr., 46, 301 (1970).
55. Brinkman U. A. T., de Vries G., J. Chromatogr., 18, 142 (1965).
56. Brinkman U. A. T., de Vries G., Van Dalen E., J. Chromatogr., 22, 407 (1966).
57. Brinkman U. A. T. et al., J. Chromatogr., 23, 287 (1966).
58. Brinkman U. A. T. et al., J. Chromatogr., 25, 447 (1966).
59. Brinkman U. A. T., Steerenburg P. J. J., de Vries G., J. Chromatogr., 54, 449 (1971).
60. Brinkman U. A. T., de Vries G., J. Chromatogr., 56, 103 (1971).
61. Leene H. R., de Vries G., Brinkman U. A. T., J. Chromatogr., 80, 221 (1973).
62. Rai J., Kukreja V. P., Chromatographia, 3, 499 (1970).
63. Cassidy R. M., Miketuková V., Frei R. W., Anal. Lett., 5, 115 (1972).
64. Olsina R., Dapas R., Marone C., J. Chromatogr., 75, 93 (1973).
65. Breccia A., Spalletti F., Nature, 198, 756 (1963).
66. Breccia A., Metodi Sep., Nella Chim. Inorg., 2, 137 (1963).
67. Seiler H., Rothweiler W., Helv. Chim. Acta, 44, 941 (1961).
68. Oguma K., Anal. Chem., 39, 1003 (1957).
69. Bottura G., Breccia A., Marchetti F., Spalletti F., Ric. Sci., Rend., Ser., A, 6, 373 (1964).
70. Bottura G., Breccia A., Ric. Sci., 37, 295 (1967).
71. Moghissi A., J. Chromatogr., 13, 542 (1964).
72. Вольнец М. П., Гусева Л. И., Ж. Анал. хим., 23, 947 (1968).
73. Seiler H., Seiler M., Helv. Chim. Acta, 53, 601 (1970).
74. Бабалян Х. С., Варшал Г. М., Журн. Анал. хим., 28, 921 (1973).
75. Вагина Н. С., Вольнец М. П., Журн. Анал. хим., 23, 521 (1968).
76. Вольнец М. П., Вагина Н. С., Фомина Т. В., Факина Л. К., Журн. Анал. хим., 24, 1477 (1969).
77. Вагина Н. С., Фокина Л. К., Завод. лаб., 34, 928 (1968).
78. Oguma K., Talanta, 15, 860 (1968).
79. Pierce T. B., Flint R. F., Anal. Chim. Acta, 31, 595 (1964).
80. Danneels A., Massert D. L., Hoste J., J. Chromatogr., 18, 144 (1965).
81. Holzapfel H., Le-Viet-Lan, Werner G., J. Chromatogr., 20, 580 (1965).
82. Holzapfel H., Le-Viet-Lan, Werner G., J. Chromatogr., 24, 153 (1966).
83. Seiler H., "Thin-Layer Chromatography of Inorganic Ions", in "Thin-Layer Chromatography", E. Stahl, Ed., Academic Press, New York, 1965, p. 478. Хроматография в тонких слоях, Пер. с нем./Под ред. Э. Шталя, М.: Мир, 1965, гл. 22, с. 462.
84. Hammerschmidt H., Müller M., Papier, 17, 448 (1963).
85. Seiler H., Helv. Chim. Acta, 46, 2629 (1963).
86. Purdy S. J., Truter E. V., Analyst (London), 87, 802 (1962).
87. Janauer G. E., Carranò J. D., Johnston R. C., Microchim. Acta, 1968, 61.
88. Lesigang-Buchtela M., Microchim. Acta, 1969, 1027.
89. Handa A. C., Johri K. N., Chromatographia, 4, 530 (1971).
90. Pollard F. H., McOmie J. F. W., Stevens H. M., J. Chem. Soc., 1951, 771.
91. Johri K. N., Saxena B. S., Mehra H. C., Chromatographia, 4, 351 (1971).
92. Verma M. R., Rai J., Less-Common Metals, 15, 237 (1968).
93. Yamamoto D., Uno H., J. Chromatogr., 51, 348 (1970).
94. Hashmi M. H., Adil A. S., Microchim. Acta, 1968, 947.
95. Hashmi M. H., Adil A. S., Z. Anal. Chem., 277, 170 (1967).
96. Гайбакян Д. С., Есикян Р. Т., Армянск. хим. журн., 23, 16 (1970).
97. Gagliardi E., Shambri H., Microchim. Acta, 1969, 155.
98. Takitani S., Fukazawa M., Hasegawa H., Bunseki Kagaku, 12, 1156 (1963); Chem. Abstr., 60, 4767 (1964).
99. Takitani S., Fukuoka N., Iwasaki Y., Hasegawa H., Bunseki Kagaku, 13, 469 (1964).
100. Druding L. F., Anal. Chem., 33, 1582 (1963).
101. Merkus F. W. H. M., Pharm. Weekbl., 98, 947 (1963).
102. Zellmeisl M. J., Haworth D. T., J. Chromatogr., 30, 637 (1967).



103. Kaushik N. K., Johri K. N., *Chromatographia*, **9**, 233 (1976).
104. Hashmi M. H., Shahid M. A., Ayaz A. A., Chughtai F. R., Hassan N., Adil A. S., *Anal. Chem.*, **38**, 1554 (1966).
105. Husain S. W., Eivazi F., *Chromatographia*, **8**, 277 (1975).
106. Zabin B. A., Rollins C. B., *J. Chromatogr.*, **14**, 534 (1964).
107. Oguma K., *Chromatographia*, **8**, 669 (1975).
108. Kuroda R., Kojima N., Oguma K., *J. Chromatogr.*, **69**, 223 (1972).
109. Frache R., Dadone A., *Chromatographia*, **4**, 156 (1971).
110. Frache R., Dadone A., *Chromatographia*, **6**, 475 (1973).
111. Shimizu T., Kogure Y., Aria H., Suda T., *Chromatographia*, **9**, 85 (1976).
112. Lepri L., Desideri P. G., *J. Chromatogr.*, **84**, 155 (1973).
113. Lepri L., Desideri P. G., Coas V., Cozzi D., *J. Chromatogr.*, **47**, 442 (1970).
114. Berger J. A., Meyniel C., Petit J., Blanquet P., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 2662.
115. Lepri L., Desideri P. G., Mascherini R., *J. Chromatogr.*, **70**, 212 (1972).
116. Shimizu T., Muto A., *J. Chromatogr.*, **88**, 351 (1974).
117. Ishida K., *Bunseki Kagaku*, **19**, 1250 (1970); *Chem. Abstr.*, **74**, 68148n (1971).
118. Berger J. A., Meyniel C., Petit J., *Compt. Rend.*, **259**, 2231 (1964).
119. Berger J. A., Meyniel C., Petit J., *J. Chromatogr.*, **29**, 190 (1967).
120. Lesigang M., *Microchim. Acta*, **1964**, 34.
121. van R. Smit J., Jacobs J. J., Robb W., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **12**, 95, 104 (1959).
122. Lesigang M., Hecht F., *Microchim. Acta*, **1964**, 508.
123. Kawamura S., Kurotaki K., Kuraku H., Izawa M., *J. Chromatogr.*, **26**, 557 (1967).
124. Oguma K., Kuroda R., *J. Chromatogr.*, **61**, 307 (1971).
125. Oguma K., Kuroda R., *J. Chromatogr.*, **52**, 339 (1970).
126. Kuroda R., Kondo T., *J. Chromatogr.*, **80**, 241 (1973).
127. Kuroda R., Yoshikuni N., Kawabuchi K., *J. Chromatogr.*, **47**, 453 (1970).
128. Pfrunder B., Zurflueh R., Seiler H., Erlenmeyer H., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1153 (1962).
129. Moghissi A., *Anal. Chim. Acta*, **30**, 91 (1964).
130. Takitani S., Suzuki M., Fujita N., Hizumi K., *Bunseki Kagaku*, **14**, 597 (1965).
131. Buchtela K., Lesigang-Buchtela M., *Microchim. Acta*, **1967**, 380.
132. Макарова Т. П., Степанов А. В., *Журн. Анал. хим.*, **26**, 1823 (1971).
133. Frache R., Dadone A., *Chromatographia*, **6**, 430 (1973).
134. Frache R., Dadone A., *Chromatographia*, **6**, 266 (1973).
135. van Ooij W. J., Houtman J. P. W., *Z. Anal. Chem.*, **236**, 407 (1969).
136. Seiler H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1753 (1961).
137. Pilson M. E. Q., Fragala R. J., *Anal. Chim. Acta*, **52**, 553 (1970).
138. Roessel T., *Z. Anal. Chem.*, **197**, 333 (1963).
139. Aurenge J., Degeorges M., Normand J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1964**, 508.
140. Clesceri N. L., Lee G. F., *Anal. Chem.*, **36**, 2207 (1964).
141. Baudler M., Stuhlmann F., *Naturewissenschaften*, **51**, 57 (1964).
142. Baudler M., Mengel M., *Z. Anal. Chem.*, **206**, 8 (1964).
143. Baudler M., Mengel M., *Z. Anal. Chem.*, **211**, 42 (1965).
144. Covello M., Schettino O., *Farmaco (Pavia), Ed. Prat.*, **20**, 396 (1965).
145. Seiler H., Kaffenberger T., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1282 (1967).
146. Tustanowski S., *J. Chromatogr.*, **31**, 270 (1967).
147. Petrović S. M., Canić V. D., *Z. Anal. Chem.*, **228**, 339 (1967).
148. Haworth D. T., Ziegert R. M., *J. Chromatogr.*, **38**, 544 (1968).
149. Berger J. A., Meyniel G., Petit J., *Compt. Rend.*, **255**, 1116 (1962).
150. Muto M., *Nippon Kagaku Zasshi*, **85**, 147 (1964); *Chem. Abstr.*, **61**, 15326 (1964).
151. Muto M., *Nippon Kagaku Zasshi*, **86**, 91 (1965).
152. Seiler H., Erlenmeyer H., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 264 (1964).
153. Handa A. C., Johri K. N., *Talanta*, **20**, 219 (1973).
154. Palagyi S., Zaduban M., *Chem. Zvesti*, **23**, 876 (1969).
155. Lederer M., Sinibaldi M., *J. Chromatogr.*, **60**, 275 (1971).
156. Peschke W., *J. Chromatogr.*, **20**, 572 (1965).
157. Phipps A. M., *Anal. Chem.*, **43**, 467 (1971).
158. Johri K. N., Kaushik N. K., Singh K., *Microchim. Acta*, **1969**, 737.
159. Siechowski J., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **9**, 391 (1964).
160. Dobici F., Grassini G., *J. Chromatogr.*, **10**, 98 (1963).
161. Kawahabe K., Takitani S., Miyazaki M., Tamura Z., *Bunseki Kagaku*, **14**, 354 (1965).
162. Kawahabe K., Takitani S., Miyazaki M., Tamura Z., *Bunseki Kagaku*, **13**, 976 (1964).
163. Hashmi M. H., Chughtai N. A., *Microchim. Acta*, **1968**, 1040.
164. Canić V. D., Turčić M. N., Bugarski-Vojinović M. B., Perisić N. U., *Z. Anal. Chem.*, **229**, 93 (1967).

## АДРЕСА ФИРМ, УПОМИНАЕМЫХ В ТЕКСТЕ

Aldrich Chemical Co., Inc., 940 W. Saint Paul Ave., Milwaukee, Wis. 53233.  
 Allied Chemical Corporation, General Chemical Division, 40 Rector St., New York, N. Y. 10006.  
 American Cyanamide Co., Industrial Chemicals and Plastics Division, Berdan Ave., Wayne, N. J. 07470.  
 Analabs, Analytical Engineering Laboratories, Inc., P. O. Box 5215, Hamden, Conn. 06514.  
 Analtech, Inc., 100 South, Justison St., Wilmington, Del. 19801.  
 Anton Paar, AG, Graz, Austria.  
 Applied Science Laboratories, Inc., P. O. Box 140, State College, Pa.  
 Arthur H. Thomas Co., Inc., Vine Street at Third, P. O. Box 779, Philadelphia, Pa. 19105.  
 Avicel Sales Division, American Viscose Co., FMC Corp., Marcus Hook, Pa.  
 Badische Anilin und Soda Fabrik, Ludwigshafen am Rhein, Germany.  
 Baird Atomic, 33 University Road, Cambridge, Mass. 02139.  
 Baird and Tatlock, Ltd., Chadwell Heath, Essex, England.  
 J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J. 08865.  
 Best Foods Division, CPC International, Inc., 25 Continental Dr., Wayne, N. J. 07674.  
 Biomed Instruments, Inc., Suite 2000, 6 N. Michigan Ave., Chicago, Ill., 60602.  
 Bio-Rad Laboratories, 32nd and Griffin Ave., Richmond, Calif. 94804.  
 Brinkmann Instruments, Inc., Cantigue Road, Westbury, N. Y. 11590.  
 Buchard Scientific, Ltd., Rickmansworth, Great Britain.  
 Calbiochem, 10933 N. Terrey Pines Rd., La Jolla, Calif. 92037.  
 CAMAG A. G., Muttentz B. L., Homburger, Str., 24 Switzerland.  
 CAMAG, Inc., 16229 W. Ryerson Rd., New Berlin, Wis., 53151.  
 Chemetron, Via Gustavo Modena, 24, Milano, Italy.  
 Chemical Research & Development Center, FMC Corp., Box 8, Princeton, N. J. 08540.  
 Chemirad Corp. P. O. Box 187, East Brunswick, N. J. 08816 (U. S. Rep. of Badische Anilin und Soda Fabrik).  
 Chemplast, Inc., 150 Dey Rd., Wayne, N. J. 07470.  
 Chen-Chin Trading Co., Ltd., # 75, Section 1, Hankow St., Taipei, Taiwan, Republic of China.  
 Chinoin-Nagyfűtény, Budapest, Hungary.  
 Clarkson Chemical Co., Inc., 213 Main, S. W., Williamsport, Pa., 17707.  
 Clinton Corn Processing Co., Clinton, Iowa.  
 CoLab, Glenwood, Ill.  
 Colab Laboratories, Inc., Chicago Heights, Ill.  
 Columbia Chemicals Co., Columbia, S. C.  
 Connaught Medical Laboratories, University of Toronto, Toronto, Canada.  
 Consolidated Laboratories, Inc., P. O. Box 234, Chicago Heights, Ill. 60412 (U. S. Rep. of Shandon Scientific Co., Ltd.).  
 Corning Glass Works, 1964 Crystal St., Corning, N. Y. 14830.  
 Crystal X Corp., Darcy, Pa.

C. Desaga, G. m. b. H., Heidelberg, Hauptstr. 60, Germany.  
 Distillation Products Industries, Ridge Road West, Rochester, N. Y. 14603.  
 The Dow Chemical Corp., 1000 Miami, Midland, Mich. 48640.  
 Drummond Scientific Co., 500 Parkway, Broomall, Pa. 19008.  
 E. I. du Pont de Nemours & Co., Photo Products Department, Wilmington, Del.  
 Dylon International, London, Great Britain.  
 Eastman Kodak Co., 343 State St., Rochester, N. Y. 14608.  
 E-C Apparatus Corp., 3831 Tyrone Blvd., N., St. Petersburg, Fla. 33709.  
 Fabwerke Hoechst, A. G., Frankfurt, am Main, Germany.  
 Fisher Scientific, Fair Lawn, N. J.  
 Floridin Co., 2 Gateway Center, Pittsburgh, Pa.  
 Fluka, A. G., Buchs S. G., Switzerland.  
 FMC Corporation, 2000 Market St., Philadelphia, Pa. 19103.  
 Gallard-Schlesinger Chemical Mfg. Corp., 580 Mineola Ave., Carle Place, Long Island, N. Y. 11514 (Rep. of Serva-Entwicklungslabor Co.).  
 Gelman Instrument Co., P. O. Box 1148, Ann Arbor, Mich. 48107.  
 General Aniline and Film Corp., Dyestuff and Chemical Division, 435 Hudson St., New York, N. Y. 10014.  
 General Electric Co., Insulating Materials Department, 1 Campbell Road, Schenectady, N. Y. 12306.  
 Glasurit-Werke M. Winkelmann A. G., Analytisches Laboratorium, 4403 Hiltrup, Westf., Germany.  
 M. Grumbacher, Inc., 466 W. 34th St., New York, N. Y. 10001.  
 Hamilton Co., Inc., P. O. Box 307, Whittier, Calif. 90608.  
 Harshaw Chemical Co., 1945 East 97th St., Cleveland, Ohio 44106.  
 Hercules Powder Co., 900 Market St., Wilmington, Del. 19801.  
 Hoffmann-La Roche, Inc., Kingsland Rd. and Bloomfield Ave., Nutley, N. J. 07110.  
 Ingold, A. G., Zurich, Switzerland.  
 Instrumentation Laboratory, Inc., Watertown, Mass.  
 Johns-Manville Corp., Celite Division, 22 E. 40th St., New York, N. Y. 10016.  
 Kensington Scientific Corp., 1717 Fifth Street, Berkeley, Calif. 94710.  
 Kontes, Vineland, N. J. 08360.  
 Leuchtstoffwerk, G. m. b. H. & Co., Vertriebsgesellschaft, Heidelberg, Germany.  
 Lightner Instrument Co., West Chester, Pa.  
 LKB Producter-AB, Stockholm, Sweden.  
 Macherey, Nagel & Co., Dueren, Rhineland, Germany.  
 Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo. 63160.  
 K. Marggraf Co., Berlin, Germany.  
 Matheson, Coleman & Bell, 333 Paterson Plank Road, East Rutherford, N. J. 07073.  
 May and Baker, Ltd., Dagenheim, Essex RM107XS, England.  
 Mercer Chemical Corp., 216 Lake Ave., Yonkers, N. Y. 10701.  
 E. Merck, A. G., Chemische Fabrik, Darmstadt, Germany.  
 E. Merck, Ltd., Winchester Rd., Four Marks, Alton, Hampshire, Great Britain.  
 Microchemical Specialties Co., 1825 Eastshore Highway, Berkeley, Calif. 94710.  
 3M Company, Atlanta Branch, Industrial Chemical Division, 2860 Bankers Industrial Dr., Atlanta, Ga. 30360.  
 Packard Instrument Co., P. O. Box 428, La Grange, Ill. 60526.  
 Pallflex Products Corp., Glen Cove, N. Y. 11542.  
 Peninsular Chemical Research, Inc., Gainesville, Fla.  
 Pharmacia, Uppsala, Sweden.  
 Pharmacia Fine Chemicals, Inc., 501 Fifth Avenue, New York, N. Y. 10017 (U. S. Rep. of Pharmacia).  
 Philip A. Hunt Co., Palisade Park, N. J. 07650.  
 Pittsburgh Plate Glass Co., Chemical Division, One Gateway Center, Pittsburgh 22, Pa.

- R. S. A. Corp., Ardsley, N. Y. 10502.  
 H. Reeve Angel & Co., Inc., 9 Bridewell Place, London, E. C. 4, Great Britain.  
 H. Reeve Angel & Co., Inc., 52 Duane St., New York, N. Y. 10007.  
 Regis Chemical Co., Morton Grove, Ill. 60053.  
 Research Specialties, Co., 200 S. Garrard Blvd., Richmond, Calif. 94804.  
 Rohm & Haas, Independence Hall W., Philadelphia, Pa. 19105.  
 C. Schleicher & Schuell Co., Dassel, Krs. Einbeck, Germany.  
 C. Schleicher & Schuell Co., 543 Washington St., Keene, N. H. 03431.  
 Serometrics, Inc., P. O. Box 66, Chicago Heights, Ill. 60412 (U. S. Rep. of Chemetron).  
 Serva-Entwicklungslabor Co., Heidelberg, Germany.  
 Shandon Scientific Co., Ltd., 65 Pound Lane, Willesden, London NW 10, Great Britain.  
 Spolana N. E., Neratovice, CSSR (Czechoslovakia).  
 Stein-Hall Co., Inc., 285 Madison Ave., New York, N. Y. 10017.  
 Technicon Corp., Tarrytown, N. Y. 10591.  
 Toyo Rayon Co., Tokyo, Japan.  
 G. K. Turner Associates, 2524 Pulgas Ave., Palo Alto, Calif. 94303.  
 Ultra-Violet Products, Inc., 5114 Walnut Grove Ave., San Gabriel, Calif. 91776.  
 Union Carbide Plastics Division, Clifton, N. J. 07012.  
 Union Carbide Corp., Film Packaging Division, 6733 West 65 St., Chicago Ill. 60638.  
 U. S. Radium Corp., 537 Pearl St., New York, N. Y. 10007.  
 Wako Pure Chemicals, Ltd., Osaka, Japan.  
 Warner-Chilcott Laboratories Instrument Division, Warner-Lambert Pharmaceutical Co., 20 South Garrard Blvd., Richmond, Calif. 94801.  
 Waters Associates, Inc. (U. S. distributor for Woelm), 61 Fountain St., Framingham, Mass. 10701.  
 Waverly Chemical Co., Mamaroneck, N. Y. 10543.  
 Westvaco Chloralkali Division, Food, Machinery & Chemical Corp., 161 East 42nd St., New York, N. Y. 10017.  
 West Virginia Pulp & Paper Co., Industrial Chemical Sales Division, 230 Park Ave., New York, N. Y. 10017.  
 Whatman, Inc., 9 Bridewell Place, Clifton, N. J. 07014.  
 M. Woelm Co., Eschwege, Germany.

## СОДЕРЖАНИЕ

## Часть II:

## ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

## (продолжение)

Глава XXI. Красители . . . . .	5
1. Пищевые красители, растворимые в органических средах . . .	5
Адсорбционная хроматография . . . . .	5
Количественное определение красителей, растворимых в органических средах . . . . .	10
Хроматография с обращенными фазами . . . . .	10
2. Пищевые водорастворимые красители . . . . .	11
3. Красящие вещества чернил . . . . .	16
4. Красители для гистологических работ . . . . .	19
5. Индикаторы . . . . .	21
6. Косметические красители . . . . .	22
Красители для губной помады . . . . .	23
Красители для волос . . . . .	24
7. Флуоресцентные красители . . . . .	25
8. Текстильные красители . . . . .	26
Прямые красители . . . . .	27
Кислотные красители . . . . .	27
Основные красители . . . . .	28
Дисперсные красители . . . . .	29
Реактивные красители . . . . .	30
Протравные красители . . . . .	31
Азокрасители и азокомпоненты красителей . . . . .	31
Красители, применяемые с растворителями . . . . .	32
9. Прочие красители . . . . .	33
10. Разделение красителей методом электрофореза . . . . .	35
Литература . . . . .	35
Глава XXII. Углеводороды . . . . .	39
Литература . . . . .	49
Глава XXIII. Липиды . . . . .	52
1. Фракционирование по классам соединений . . . . .	52
2. Разделение триглицеридов . . . . .	60
3. Разделение моно- и диглицеридов . . . . .	65

4. Разделение жирных кислот . . . . .	66
Простагландины . . . . .	68
5. Разделение производных жирных кислот . . . . .	69
6. Разделение метиловых эфиров жирных кислот . . . . .	74
7. Разделение фосфолипидов, сфинголипидов и гликолипидов . . . . .	86
8. Воски . . . . .	97
9. Количественный анализ липидов . . . . .	98
10. Прочие исследования липидов методом ТСХ . . . . .	103
Литература . . . . .	106
<b>Глава XXIV. Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды . . . . .</b>	<b>116</b>
1. Разделение на слоях силикагеля . . . . .	116
2. Разделение на целлюлозе . . . . .	118
3. Разделение на модифицированной целлюлозе . . . . .	122
Диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE-целлюлоза) . . . . .	122
ЕСТЕОЛА-целлюлоза . . . . .	125
Полиэтилениминцеллюлоза (PEI-целлюлоза) . . . . .	127
Полифосфатцеллюлоза . . . . .	134
4. Разделение на сефадексе . . . . .	134
5. Разделение на слоях ионообменников . . . . .	135
6. Электрофоретическое разделение . . . . .	135
7. Количественный анализ . . . . .	137
8. Прочие исследования . . . . .	138
Литература . . . . .	139
<b>Глава XXV. Пестициды . . . . .</b>	<b>143</b>
1. Хлорсодержащие соединения . . . . .	150
2. Фосфорсодержащие соединения . . . . .	159
3. Карбаматы . . . . .	166
4. Пиретрины и другие инсектициды растительного происхождения . . . . .	167
5. Прочие пестициды . . . . .	169
6. Синергические добавки к инсектицидам . . . . .	170
7. Фунгициды . . . . .	172
8. Гербициды . . . . .	175
Литература . . . . .	180
<b>Глава XXVI. Лекарственные средства . . . . .</b>	<b>185</b>
1. Определение наркотиков в биологических материалах . . . . .	185
2. Снотворные средства . . . . .	189
3. Психотропные средства . . . . .	195
Транквилизаторы . . . . .	195
Галлюциногены . . . . .	203
Антидепрессанты и возбуждающие средства . . . . .	205
4. Противогистаминные средства . . . . .	207
5. Болеутоляющие (анальгетики) и жаропонижающие средства . . . . .	207
6. Симпатомиметики . . . . .	211
7. Препараты для местной анестезии . . . . .	213
8. Лекарственные сульфопрепараты . . . . .	215
9. Сердечные гликозиды . . . . .	219
10. Антикоагулянты . . . . .	224
11. Противодиабетические средства . . . . .	225
12. Противосудорожные средства . . . . .	225
13. Лекарственные средства против малярии . . . . .	226

14. Лекарственные средства от кашля . . . . .	226
15. Бактерицидные средства . . . . .	226
16. Противозачаточные средства . . . . .	227
17. Мочегонные средства . . . . .	228
18. Слабительные средства . . . . .	228
19. Некоторые лекарственные препараты растительного происхождения . . . . .	228
20. Прочие лекарственные средства . . . . .	230
Литература . . . . .	231
<b>Глава XXVII. Фенолы . . . . .</b>	<b>238</b>
1. Непосредственное разделение на закрепленных слоях силикагеля . . . . .	238
2. Непосредственное разделение на незакрепленных слоях силикагеля . . . . .	245
3. Непосредственное разделение на слоях полиамида . . . . .	246
4. Разделение на ионообменных слоях . . . . .	248
5. Разделение на целлюлозе . . . . .	249
6. Разделение на прочих адсорбентах . . . . .	250
7. Разделение методом электрофореза . . . . .	251
8. Разделение производных фенолов . . . . .	251
Литература . . . . .	254
<b>Глава XXVIII. Природные пигменты . . . . .</b>	<b>257</b>
1. Каротиноиды . . . . .	257
Количественное определение . . . . .	264
Препаративное разделение . . . . .	264
2. Хлорофиллы . . . . .	264
3. Антоцианы . . . . .	267
4. Флавоноиды и родственные соединения . . . . .	271
5. Антохлоры . . . . .	277
6. Порфирины . . . . .	278
7. Желчные пигменты . . . . .	280
Литература . . . . .	281
<b>Глава XXIX. Стероиды . . . . .</b>	<b>285</b>
1. Стерины и стериновые эфиры . . . . .	285
Разделение свободных стеринов . . . . .	285
Разделение эфиров стеринов . . . . .	292
Количественное определение стеринов и эфиров стеринов . . . . .	296
2. С <sub>18</sub> -Стероиды . . . . .	299
Качественное разделение . . . . .	299
Количественное определение . . . . .	308
3. С <sub>19</sub> -Стероиды . . . . .	312
Качественное разделение . . . . .	312
Количественное определение . . . . .	320
4. С <sub>21</sub> -Стероиды . . . . .	322
Качественное разделение . . . . .	322
Количественное определение . . . . .	333
5. Желчные кислоты . . . . .	337
Качественное разделение . . . . .	337
Количественное определение . . . . .	343
6. Стероидные сапогенины и сапонины . . . . .	344
7. Стероидные алкалоиды . . . . .	349

8. Яды жаб . . . . .	350
9. Прочие работы по стероидам . . . . .	350
Литература . . . . .	352
<b>Глава XXX. Терпены и эфирные масла . . . . .</b>	<b>362</b>
1. Углеводороды . . . . .	362
2. Спирты . . . . .	365
3. Карбонильные соединения . . . . .	369
4. Фенолы . . . . .	375
5. Кислоты и сложные эфиры . . . . .	378
6. Оксиды и пероксиды . . . . .	381
7. Эфирные масла . . . . .	382
Масла мяты . . . . .	382
Масла хмеля . . . . .	383
Масла цитрусовых . . . . .	384
Летучие вещества, содержащиеся в морских водорослях . . . . .	385
Прочие работы по анализу эфирных масел методом ТСХ . . . . .	385
Литература . . . . .	393
<b>Глава XXXI. Витамины . . . . .</b>	<b>402</b>
1. Жирорастворимые витамины . . . . .	402
Витамин А и родственные соединения . . . . .	402
Витамин D . . . . .	407
Витамин E . . . . .	409
Витамин K и родственные хиноны . . . . .	413
2. Водорастворимые витамины . . . . .	416
Смеси водорастворимых витаминов . . . . .	416
Витамин B <sub>1</sub> . . . . .	419
Витамин B <sub>6</sub> . . . . .	420
Витамин B <sub>12</sub> . . . . .	422
Витамин B <sub>2</sub> . . . . .	423
Никотиновая кислота и никотинамид . . . . .	424
Витамин C . . . . .	425
Фолиевая кислота . . . . .	427
Пантотеновая кислота . . . . .	428
Прочие водорастворимые витамины . . . . .	428
Литература . . . . .	429
<b>Глава XXXII. Различные органические соединения . . . . .</b>	<b>433</b>
1. Микотоксины . . . . .	433
2. Клен . . . . .	439
3. Антиоксиданты . . . . .	439
4. Непищевые антиоксиданты . . . . .	446
5. Взрывчатые вещества . . . . .	449
6. Металлоорганические соединения . . . . .	451
Оловоорганические стабилизаторы . . . . .	451
Производные ферроцена . . . . .	453
Прочие металлоорганические соединения . . . . .	453
7. Органические соединения фосфора и серы . . . . .	454
8. Пероксиды, эпокси соединения и озониды . . . . .	457
9. Гормоны растений . . . . .	460
Гиббереллины . . . . .	460
Индолилуксусная кислота и другие гормоны . . . . .	463
10. Пластификаторы . . . . .	463

11. Поверхностно-активные вещества . . . . .	468
12. Синтетические заменители сахара . . . . .	470
13. Поглотители УФ-излучения . . . . .	471
14. Различные хиноны . . . . .	472
15. Прочие соединения . . . . .	472
Литература . . . . .	473
<b>Глава XXXIII. Неорганические ионы . . . . .</b>	<b>480</b>
1. Катионы . . . . .	480
Разделение на слоях силикагеля и целлюлозы . . . . .	480
Разделение на ионообменных смолах . . . . .	498
2. Анионы . . . . .	504
Фосфаты . . . . .	504
Галогениды . . . . .	507
Другие анионы . . . . .	508
Литература . . . . .	511
<b>Приложение Б. Адреса фирм, упоминаемых в тексте . . . . .</b>	<b>516</b>