

TECHNIQUES OF CHEMISTRY
VOLUME XIV

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Second Edition

by
JUSTUS 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

! В ДВУХ ТОМАХ

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО
канд. хим. наук Д. Н. СОКОЛОВА
и канд. техн. наук М. И. ЯНОВСКОГО

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
доктора хим. наук проф. В. Г. БЕРЕЗКИНА

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

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 даны описание аппаратуры и техники применения тонкослойной хроматографии и развернутый перечень систем, где метод может быть использован в аналитических целях.

В русском издании книга выходит в 2-х томах. В первом томе рассматривается теория ТСХ.

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

Окружающий нас мир — мир сложных смесей соединений различной природы и молекулярной массы. Его изучение, включая контроль и управление химическими процессами в промышленности и исследование и диагностику биохимических процессов в живом организме, — сложнейшая задача, которую успешно решает аналитическая химия; именно поэтому многие исследователи-химики выступают одновременно и в роли аналитиков.

Определить состав многокомпонентной смеси и особенно выявить присутствие примесей, пользуясь каким-либо одним методом обычно не удается; как правило, при решении таких задач приходится оперировать группой методов, разумно их комбинируя. Такие комбинированные, или по образному выражению Ю. А. Золотова [1] гибридные, методы широко распространены в аналитической практике. Не будет преувеличением сказать, что современная аналитическая химия — это химия гибридных методов. Анализируя последние, можно отметить, что все они представляют собой сочетание трех групп методов: методов определения [1], разделения [1] и химической трансформации анализируемых компонентов [2]. Наиболее активно развиваются и применяются, по-видимому, методы разделения, роль и значение которых особенно велики в аналитической химии органических соединений.

Тонкослойная хроматография занимает особое место среди методов разделения благодаря простоте методики и доступности оборудования, широкой области применения, включающей органические и неорганические объекты, высокой экономичности, гибкости метода, позволяющей легко модифицировать его в соответствии с поставленной задачей.

Тонкослойная хроматография — вид жидкостной хроматографии, в которой роль подвижной фазы выполняет жидкая фаза, а разделение происходит на слое сорбента, толщина которого существенно меньше его ширины. В наиболее распространенном варианте тонкослойной хроматографии слой сорбента (более точно — одна его сторона) открыт, а движение подвижной фазы происходит как результат пропитки сорбционного слоя растворителем, который используется как элюент.

Редакция литературы по химии

1805000000

К 20503—072
041(01)—81 72—81, ч. 1

- © 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.

История возникновения и развития этого метода отражена в работах Цвета [3, 4], Измайлова и Шрайбер [5] и Штала [6].

В настоящее время тонкослойная хроматография представляет собой обширную, хорошо разработанную область. Роль и значение этого метода анализа, несмотря на развитие автоматизированной высокоэффективной детекторной и жидкостной хроматографии, несколько не уменьшились, напротив, область тонкослойной хроматографии расширилась, метод стал применяться для экспрессного определения условий разделения в колоночной жидкостной хроматографии (выбор адсорбента, состава элюента и т. д.). Благодаря простоте и гибкости тонкослойной хроматографии она продолжает оставаться одним из наиболее популярных хроматографических методов.

Книга Ю. Кирхнера «Тонкослойная хроматография» представляет собой обширное руководство по тонкослойной хроматографии. В ней наряду с описанием общих методов тонкослойной хроматографии большое внимание уделяется вопросам ее практического применения. Поэтому книга представляет интерес для широкого круга специалистов: и для тех, кто интересуется в основном только практическим применением метода для анализа соединений определенного класса, и для тех, для кого главное — развитие метода; ее можно также рекомендовать и как пособие для начинающих хроматографистов. В сущности, это небольшая энциклопедия по тонкослойной хроматографии, которая несомненно позволит многим аналитикам сэкономить время, повысить уровень и эффективность аналитических работ в этой области хроматографии.

Следует отметить, что вопросы высокоэффективной тонкослойной хроматографии достаточно полно изложены также Златкисом и Кайзером [7], а сведения по отечественному оборудованию для тонкослойной хроматографии читатель может найти в книге Кибардина и Макарова [8].

В современной тонкослойной хроматографии начинают эффективно использоваться автоматические оптические сканирующие методы, специально предназначенные для тонкослойных пластинок с разделенными зонами. Такие методы позволяют точно и объективно определять содержание разделенных компонентов [7]. Это большой успех в развитии тонкослойной хроматографии, так как ранее во многих статьях и монографиях отмечалось, что стадия количественной оценки результатов измерения или недостаточна точна, или очень длительна.

В последние годы была опубликована работа, позволяющая надеяться, что и второй недостаток тонкослойной хроматографии (а именно продолжительность разделения) удастся успешно преодолеть.

Речь идет о пионерской работе венгерских исследователей, предложивших вариант тонкослойной хроматографии с принудительным потоком элюента. Применение этого варианта обеспечивает существенное ускорение процесса разделения [9]. Таким образом, и в настоящее время продолжается эффективное развитие тонкослойной хроматографии.

В. Березкин

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотов Ю. А. Очерки аналитической химии — М: Химия, 1977
2. Березкин В. Г. Химические методы в газовой хроматографии — В кн. IV Всес. конференции по аналитической химии органических соединений (тезисы докладов). — М: Наука, 1979, с 8
3. Цвет М. С. Труды Варшавского общества естествоиспытателей, отд. биологии, 14, 20 (1903).
4. Tswett M. Berichte deutsch. bot. Ges., 24, 316, 384 (1906).
5. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. — Фармация, № 3, 1 (1938).
6. Хроматография в тонких слоях Пер. с нем/Под ред. Э. Штала — М.: Мир, 1965.
7. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Пер. с англ/Под ред. А. Златкиса и Р. Кайзера. — М.: Мир, 1979.
8. Кибардин С. А., Макаров К. А. Тонкослойная хроматография в органической химии — М: Химия, 1978.
9. Thyihak E., Mincsovic E., Kalasz H., J. Chromatogr., 174, 75 (1979).

ПРЕДИСЛОВИЕ К СЕРИИ

Серия «Методы химии» представляет собой продолжение серий «Методы органической химии» и «Методы неорганической химии». Поскольку очень часто во всех областях химии пользуются одними и теми же приемами, первоначально принятое разделение было несколько искусственным. Число методов, рассматриваемых в новой серии, соответственно возросло. Монографии, посвященные методам, применение которых ограничено, легко отличить по названиям.

Как и предыдущие серии, эта серия посвящена подробному описанию основных методов. Авторы монографий рассматривают теорию методов, технику их выполнения, приводят описание применяемой аппаратуры и указывают достоинства и недостатки методов и области их применения. Мы надеемся, что настоящая серия поможет лучшему пониманию основных методов химии и более рациональному и эффективному их использованию.

Редактор выражает особую благодарность доктору Э. Перри за помощь в редактировании этого и других томов, посвященных разделению и очистке веществ.

Авторы и редакторы надеются, что монографии данной серии окажутся полезными читателям, и будут благодарны за любые критические замечания и пожелания.

Исследовательская лаборатория
фирмы «Истмен Кодак»
Рочестер, Нью-Йорк

А. Вейсбергер

ПРЕДИСЛОВИЕ КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Наиболее важная работа по ТСХ была опубликована в 1951 г. Автор этой работы доктор Кирхнер описал разделение терпенов на открытых слоях силикагеля, которые он назвал «хроматографическими полосками» (chromatostrips). Вскоре после этого удачного начала ТСХ стала одним из наиболее полезных и удобных методов разделения химических веществ. Об этом убедительнее всего говорит наблюдаемое в последнее время резкое увеличение числа статей, в которых ТСХ оценивается как основной метод исследования.

В данной монографии рассматривается большое число публикаций по ТСХ, поэтому она не только будет полезной в повседневной практике, но и позволит получить теоретическую подготовку. Хотя, естественно, у каждого читателя свои задачи и свои проблемы, эта книга в любом случае послужит ценным справочным пособием.

Нью-Берлин, Висконсин

Р. Витек

ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

За последние пятнадцать лет тонкослойная хроматография стала одним из практически универсальных, точных и чрезвычайно полезных методов. Техника выполнения хроматографического разделения относительно проста, а требуемое оборудование недорого. Тонкослойная хроматография пригодна для исследования как летучих, так и нелетучих соединений и применяется для анализа витаминов, стероидов, лекарственных веществ, синтетических органических материалов, красок, эфирных масел, смол, пестицидов и т. д. Во многих случаях только этот метод дает ключ к практическому решению запутанных проблем. В настоящее время многие исследователи используют сочетание тонкослойной хроматографии с другими методами, в частности с газовой хроматографией.

Тема данной монографии, написанной доктором Кирхнером, — современная тонкослойная хроматография. В первой части книги описаны методики разделения, во второй — рассматривается применение метода ТСХ для решения разнообразных задач.

Уже при первом знакомстве с книгой становится ясно, что автор прекрасно разбирается в практических приемах метода и что он тщательно изучил литературу.

Мы от души приветствуем появление книги доктора Кирхнера и убеждены, что она станет настольной книгой сотрудников научных и заводских лабораторий.

Первый вице-президент фирмы
«Фрицше Бразерс», Нью-Йорк

Э. Гуэнтер

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА КО ВТОРОМУ ИЗДАНИЮ

Новейшие исследования показали, что основной принцип тонкослойной хроматографии был описан впервые Бейеринком в 1889 г. и затем Вийсменом в 1898 г. Таким образом, работа Бейеринка была выполнена не только раньше работы Измайлова и Шрайбер (1938 г.), но даже раньше первой работы Рида по колоночной хроматографии (1893 г.).

После первого издания настоящей книги в 1967 г. метод современной ТСХ, разработанный автором в 1951 г., продолжал быстро развиваться, что иллюстрируется увеличением числа публикаций, а также непрерывным появлением новых методик и модификаций. Если число публикаций по тонкослойной хроматографии в 1967 г. составляло 5000—6000, то теперь эта цифра выросла до 15 000—20 000. В данной книге цитируется более 6000 работ, опубликованных вплоть до 1975 г., а также ряд работ 1976 г. и несколько статей 1977 г.

Некоторые главы, например глава, посвященная количественному анализу, полностью пересмотрены, а во все остальные внесены изменения и дополнения. Однако общее расположение материала оставлено таким же, как и в первом издании. В книге собраны новые методики и уделено внимание специальным обозначениям, применяемым в ТСХ в различных областях химии. Это поможет читателю или читательнице добиться наилучших результатов в решении тех или иных задач. Глава, посвященная обнаруживающим реактивам, пересмотрена и расширена; в дополнении А дана таблица для выбора детектирующих реактивов для различных типов соединений и для отдельных веществ. В книге нет авторского указателя, поскольку он обычно занимает много места и в конечном счете только показывает, цитируются или не цитируются в книге работы того или иного автора. Зато мы поместили подробный предметный указатель, с помощью которого легко найти ответ на любой интересующий читателя вопрос. Помещен также отдельный указатель химических соединений, облегчающий их поиск.

Я благодарю доктора Д. Бхатну, директора исследовательского отдела фирмы «Кока-кола», за разрешение пользоваться услугами службы технической информации фирмы, а также

сотрудников этой фирмы Б. Прадхорма, М. Монтесинос, Б. Пирс и С. Блейр за помощь в поисках источников информации и выражаю признательность доктору В. Кремплю за помощь в переводах с русского, венгерского и чешского языков, Э. Вилланнуеву за переводы с испанского и Н. Девису за предоставление права на перепечатку.

Данвуди, Джорджия
май 1978 г.

Ю. Кирхнер

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

Тонкие слои адсорбента впервые были использованы для хроматографического разделения Измайловым и Шрайбер в 1938 г. и Мейнхардом и Холлом в 1948 г. Однако широкие возможности метода были открыты позднее, в 1951 г., когда автор этих строк отказался от капельной хроматографии и ввел в употребление покрытые однородным слоем адсорбента стеклянные полоски и пластинки, напоминающие бумажные хроматограммы.

Со времени появления этой новой формы ТСХ она нашла широкое применение в различных областях химии. За последние два года резко возросло число публикаций, посвященных как собственно методу, так и его использованию для решения конкретных задач.

Настоящая монография состоит из двух частей. Первая часть посвящена методическим вопросам, вторая — применению метода для решения конкретных проблем. В книге рассматриваются результаты работ, опубликованных с момента появления метода и до конца 1964 г., а также ряда работ 1965 г. Для полноты в книгу включена глава, посвященная разделению неорганических ионов.

Я считаю своим приятным долгом поблагодарить доктора Шиллингла за проявленный им интерес к этой работе, я признателен также моей супруге М. Кирхнер за постоянную поддержку, Л. Блад за перепечатку рукописи, Л. Реннеру за подготовку рисунков, моей дочери Г. Кирхнер за помощь в переводах и доктору Дж. Бобитту за предоставление права на перепечатку.

Скотч-Плейнс, Нью-Джерси

Ю. Кирхнер

Методы тонкослойной хроматографии

Глава I

ВВЕДЕНИЕ, ИСТОРИЯ И ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ

Фаррейден [1] утверждает, что первая работа по колоночной хроматографии опубликована в 1892 г. Ридом [2], который описал методику отделения хромата калия от эозина и хлорида железа от сульфата меди на каолиновых трубках. Однако еще раньше появился метод бумажной хроматографии, который был предложен Шёнбейном [3] (1861) и позднее развит его учеником Гоппельсредером [4—7]. Последний назвал этот метод «капиллярным анализом».

Большим вкладом Цвета [8] в хроматографию было использование чистых растворителей для получения хроматограмм. Первые опыты Цвета (опубликованные в 1903 г.) были посвящены разделению пигментов, содержащихся в экстрактах листьев растений. Разделение осуществлялось путем пропускания раствора пробы в петролейном эфире через колонку с карбонатом кальция. Желтый и зеленый пигменты при этом разделялись. После промывки колонки чистым растворителем Цвет разрезал ее на части и элюировал спиртом пигменты, оставшиеся на насадке. Каротин же проходил через колонку вместе с растворителем (петролейным эфиром). В описанном Цветом опыте полосы были видны на глаз, однако для хроматографирования многих бесцветных веществ необходим метод, позволяющий наблюдать за разделением на колонке неокрашенных соединений.

Позднее было разработано много методов обнаружения хроматографических полос. Сам Цвет предложил добавлять пигмент к бесцветному раствору, чтобы определять положение бесцветных зон по положению видимого стандарта. Большинство методов обнаружения зон в колоночной хроматографии основаны на исследовании выходящего из колонки

элюата; к числу таких методов относятся измерение коэффициента преломления и специфические химические реакции на индивидуальные соединения. Можно также разрезать колонку на части; применять сильно флуоресцирующие насадки [9—11]; выдавливать насадку из стеклянной трубки и наносить на нее детектирующие реактивы [12] и т. п. В 1951 г. Миллер и Кирхнер применили принцип тонкослойной хроматографии к колонке, целиком состоящей из адсорбента (без стеклянной трубки, в которую обычно засыпали адсорбент). Такую колонку можно опрыскивать обнаруживающими реактивами.

В колонках типа использованных Цветом разделяемые соединения распределяются между твердым адсорбентом и растворителем. В простейшем случае если проявляющий растворитель — элюент — движется вниз по колонке, содержащей заранее адсорбированную пробу, то последняя десорбируется до тех пор, пока не установится равновесие между адсорбированной пробой и пробой, находящейся в растворе. Перемещаясь далее вниз по колонке, этот раствор приходит в соприкосновение со свежим адсорбентом, на котором растворенная проба вновь адсорбируется. Таким образом адсорбированная проба перемещается вниз по колонке. При этом вещество, к которому адсорбент имеет большое сродство, вытесняет менее сильно сорбирующиеся соединения. В результате образуется ряд полос или слоев, причем наиболее сильно сорбирующееся вещество находится сверху, а под ним последовательно располагаются все менее и менее сильно сорбирующиеся соединения. Если адсорбционная способность разделяемых соединений примерно одинакова, полосы могут располагаться рядом, однако при заметном различии в адсорбируемости они разделяются слоем чистого адсорбента. Теоретически при достаточно длинной колонке методом хроматографии можно разделить любую пару соединений, имеющих различное сродство к адсорбенту.

В 1941 г. Мартин и Синдж [14] предложили новый вариант колоночной хроматографии — распределительную хроматографию. В этом варианте колонка заполняется твердым носителем, несущим на себе жидкую водную фазу. Через колонку пропускают не смешивающийся с водой растворитель, и разделяемые вещества распределяются между двумя жидкими фазами. Если же на колонку наносят гидрофобный растворитель, а в качестве подвижной фазы используют гидрофильный растворитель, то такой метод называется распределительной хроматографией с обращенной фазой.

Бумажная хроматография была впервые введена в практику в 1881 г. Шёнбейном [3] и Гоппельсредером [4—7] под названием «капиллярный анализ». Однако в дальнейшем она долго не использовалась и была повторно открыта Конденом и

сотр. [15]. Этот метод сыграл большую роль в анализе аминокислот, однако ему присущи два недостатка: низкая скорость разделения и очень малая адсорбционная емкость. Напротив, метод тонкослойной хроматографии позволяет быстро разделять сравнительно большие количества веществ. В то же время оказалось, что при определении малых количеств вещества тонкослойная хроматография более чувствительна, чем бумажная. Так, Фахми и сотр. [16] показали, что при разделении аминокислот на силикагеле G чувствительность определения более чем в 10 раз превышает чувствительность бумажной хроматографии. Даже при использовании слоев целлюлозы на стеклянных пластинках разделение проходит быстрее и лучше, чем при применении бумажной хроматографии в классическом варианте [17, 18].

Следует уделить некоторое внимание термину «тонкослойная хроматография». Вначале, в 1951 г. [19] и 1954 г. [20], этот метод называли «хроматография на полосках» и «хроматография на пластинках», но в настоящее время термин «тонкослойная хроматография» (ТСХ) стал настолько общепринятым, что от всех остальных терминов, например «хроматография в тонких пленках» или «хроматография в открытой колонке», следует отказаться.

2. ИСТОРИЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Фактически метод тонкослойной хроматографии был впервые применен голландским биологом Бейеринком в 1889 г. [21], который наблюдал диффузию капли смеси соляной и серной кислот по тонкому слою желатины. Соляная кислота перемещалась быстрее, чем серная, и образовывала кольцо вокруг пятна серной кислоты. Зона соляной кислоты становилась видимой при нанесении на слой раствора нитрата серебра, а зона серной кислоты обнаруживалась при нанесении раствора хлорида бария. Девятью годами позднее Вийсмен [22] с помощью аналогичного метода доказал присутствие двух ферментов в диастазе солода и показал, что только один из них расщепляет мальтозу в растворимом крахмале. Вийсмен первым использовал явление флуоресценции для обнаружения зон на тонком слое. Он ввел живущую в морской воде флуоресцирующую бактерию в слой желатины, содержащей крахмал, и наблюдал диффузию амилазной смеси по слою. Флуоресцирующая полоса появлялась только в том месте, где β -амилаза реагировала с крахмалом. Этот реактив оказался одним из наиболее чувствительных в тонкослойной хроматографии. Вийсмену удалось обнаруживать до 1/28000000 мг мальтозы, т. е. около 40 пг. История этого открытия описана [23].

В 1938 г. Измайлов и Шрайбер [24] описали применение тонкого слоя оксида алюминия, нанесенного на стеклянную пластинку. Оксид алюминия не содержал связующего материала, и на нем проводили разделение методом круговой хроматографии, т. е. каплю исследуемого раствора наносили на адсорбент и элюировали, последовательно нанося капли растворителя в центр пятна. Хроматограмма при этом имела вид концентрических зон. Авторы работы отметили пригодность описанного метода для испытания адсорбентов и растворителей для колоночной хроматографии.

Лапп и Эрали [25] в 1940 г. описали метод хроматографии на незакрепленном слое. Слой адсорбента длиной 8 см наносили на стеклянную пластинку, которую затем помещали на наклонную алюминиевую подложку. Последнюю охлаждали с верхнего края и нагревали с нижнего. Разделяемую смесь наносили на верхний край адсорбента и постепенно элюировали вниз растворителем.

Кроу [26] в 1941 г. проводил аналогичным методом подбор комбинаций адсорбент—растворитель, причем адсорбент он помещал в выемках в покровном стекле микроскопа. После того как соответствующая комбинация была выбрана, Кроу формировал в чашке Петри тонкий клиновидный слой адсорбента путем встряхивания чашки, наносил на адсорбент каплю раствора и элюировал, подавая по каплям растворитель.

В 1942 г. Бекези [27] осуществил хроматографическое разделение на слое адсорбента, помещенном между разделенными пробковой прокладкой стеклянными пластинками. Зазор между пластинками он заполнял суспензией адсорбента и полученный слой использовал как хроматографическую колонку. Микроколонки Бекези изготавливал с помощью стеклянной пластинки с неглубоким желобком, покрытой другой стеклянной пластинкой. Пластинки он склеивал агар-агаром и микроколонку заполнял суспензией адсорбента.

Несколько раньше, в 1939 г., Браун [28] описал вариант бумажной хроматографии, в котором фильтровальную бумагу помещали между двумя стеклянными пластинками. В верхней из пластинок было проделано небольшое отверстие для нанесения пробы и введения проявляющего растворителя. Таким способом можно было получить круговую хроматограмму. Для компенсации слабых адсорбционных свойств бумаги Браун предложил поместить между двумя листами бумаги слой оксида алюминия. Вильям же убрал бумагу вообще и использовал только один адсорбент, помещенный между стеклянными пластинками [29].

Мейнхард и Холл [30], проводя разделение неорганических ионов, применили крахмал в качестве связующего для закреп-

ления адсорбента (в данном случае смеси оксида алюминия и фильтрующего материала—целита) на предметных стеклах микроскопа. Целит вводили в адсорбент для того, чтобы предотвратить образование трещин на поверхности слоя. Авторы [30] использовали радиальную хроматографию, причем растворитель медленно подавали в центр пятна специальной пипеткой.

В период 1945—1954 гг. автор книги и сотрудники занимались выделением и идентификацией пахучих веществ, присутствующих в соках цитрусовых. Поскольку содержание таких веществ во фруктах чрезвычайно мало, нам необходимо было разработать микрохроматографический метод очистки и идентификации терпенов. Мы попытались воспользоваться в этих целях бумажной хроматографией, однако вскоре стало очевидно, что она не годится из-за ограниченной адсорбционной способности бумаги. Чтобы повысить адсорбционную способность бумаги, мы попробовали пропитывать ее различными реактивами. В частности, мы первыми ввели пропитку бумаги кремневой кислотой [31]. Полученные результаты оказались довольно обнадеживающими, однако приготовление пропитанной бумаги было весьма трудоемким, а ее емкость все еще недостаточной. Примерно в это время появилась статья Мейнхарда и Холла [30], и нам пришла мысль, что в принципе можно разработать метод, соединяющий в себе преимущества колоночной и бумажной хроматографии. С этой целью необходимо: 1) устранить фильтрующий материал, чтобы получить более сильный адсорбент и более твердую поверхность; возможно, для этого нужно более тщательно подобрать связующий материал, который бы не давал трещин; 2) использовать другие адсорбенты, в особенности кремневую кислоту, т. е. силикагель; 3) использовать в качестве адсорбента только материал, проходящий через сито в 100 меш (149 мкм); 4) использовать в качестве неорганического связующего алебастр вместо крахмала, поскольку последний может мешать обнаружению, образуя с проявляющим реактивом окрашенное соединение; 5) использовать полоски и пластинки больших размеров, чтобы обеспечить более эффективное разделение; 6) проводить элюирование покрытых адсорбентом пластинок в закрытой емкости восходящим током растворителя, как это делают в бумажной хроматографии; 7) использовать покрытые адсорбентом пластинки для двумерной хроматографии и 8) применять для опрыскивания хроматограмм такие реактивы, которые позволили бы не только обнаружить разделенные компоненты, но и определить типы присутствующих соединений.

Результаты этой работы были опубликованы впервые в 1951 г. [19], а в 1952—1957 гг. в серии статей была описана работа по модификации метода и его применению [13, 32—38].

Хотя в период с 1951 по 1958 г. этот метод с успехом применялся довольно многими исследователями, он в то время не привлек особого внимания. Впрочем, то же самое произошло и с колоночной хроматографией Цвета, которой мало кто интересовался вплоть до 1931 г. (Цехмейстер и Холноки [39]). Тонкослойная хроматография стала популярным методом лишь после того, как фирмы Desaga и Merck позаботились о широкой ее рекламе. Кроме того, именно в этот период Chemical Abstracts признал тонкослойную хроматографию отдельным методом и выделил ее специальным индексом, что облегчило поиск информации.

Пластинки большого размера (13×13 см) были использованы Кирхнером и сотр. [19] для двумерной хроматографии. Позднее Рейтсема [20] также проводил разделение на таких больших пластинках и ввел в практику термин «хроматоплата».

Моттиер и Поттерат [40, 41] в 1952 г. описали разделение пищевых красителей методом круговой хроматографии на незакрепленном слое оксида алюминия. Растворитель в этом случае подавали по каплям.

В 1956 г. Шталь [42] опубликовал свою первую статью по тонкослойной хроматографии, в которой он утверждал, что усовершенствовал метод, устранив трудности, связанные со «сложным приготовлением пасты адсорбента со связующим и трудоемким изготовлением гипсовых полосок». С этой целью он применил чрезвычайно тонкий порошок кремневой кислоты (0,5—5 мкм), который достаточно хорошо прилипал к стеклу и в отсутствие связующего. Однако позднее [43] Шталь вернулся к использованию однородных слоев адсорбента с гипсовым связующим (так называемый силикагель G), впервые введенного в практику Кирхнером и сотр. [19].

Хотя силикагель очень тонкого помола имеется в продаже и тонкие слои его можно наносить на стекло без всякого связующего, но эти слои довольно мягки, и многие исследователи предпочитают вводить в адсорбент связующие материалы.

Преимущества тонкослойной хроматографии, как считают Кирхнер и сотр. [19], состоят в следующем. Этот метод сочетает в себе преимущества бумажной и колоночной хроматографии, а именно легкость обнаружения разделенных компонентов путем опрыскивания пластинок различными реактивами и возможность использования всего широкого ассортимента адсорбентов, применяемого в колоночной хроматографии. Разделение происходит очень быстро (при применении некоторых растворителей хроматограмму получают всего за 30 мин). Метод позволяет быстро оценить пригодность растворителей или адсорбентов. В качестве детектирующих реактивов в тонкослойной хроматографии можно применять более агрессивные жид-

кости, чем в бумажной хроматографии. Наконец, метод ТСХ относится к числу микрохроматографических, другими словами, позволяет работать с минимальными количествами исследуемой пробы.

Для ТСХ приемлемы любые адсорбенты, применяемые в колоночной хроматографии. Однако в некоторых случаях размер частиц нужно уменьшить, чтобы получить слой с удовлетворительной поверхностью. Кирхнер и сотр. [19] испробовали 15 различных адсорбентов и нашли, что для исследования сырой нефти кремневая кислота — наилучший во всех отношениях адсорбент. Чаще всего адсорбентами служат силикагель, оксид алюминия, целлюлоза, полиамид и кизельгур (диатомитовая земля). В продажу непрерывно поступают новые адсорбенты, специально предназначенные для ТСХ.

По тонкослойной хроматографии опубликовано множество обзоров; некоторые из них содержат специальные разделы, посвященные различным применениям этого метода. Специалисту, работающему в этой области, можно рекомендовать следующие библиографические источники: библиографию, систематически публикующуюся в Journal of Chromatography, а также библиографические материалы, которые публикуются время от времени в качестве приложения к этому журналу Масеком и сотр. [44—46]; аннотированную библиографию (которая, к сожалению, грешит большим числом ошибок) Хейвуда [47] и, наконец, библиографию Йенчена [48], которая публикуется четыре раза в год фирмой SAMAG и которая в качестве приложения содержит перечень адсорбентов, растворителей и обнаруживающих реактивов, а также описание количественных методов анализа и др. Последняя библиография публикуется периодически в виде сборников [49—506]. Имеются также два реферативных сборника, опубликованных Скоттом [51, 52], и периодическое реферативное издание Саксби [53].

3. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ МЕТОДА

В ТСХ адсорбент наносят на пластинку в виде тонкого слоя. Обычно для закрепления адсорбента на поверхности применяют связующий реагент, однако авторы ряда работ проводили разделение на адсорбенте, не содержащем связующего. В этих случаях применяют очень тонкий порошок адсорбента, который прилипает к пластинке и образует довольно мягкий слой. Мягкие слои характерны также для так называемой «хроматографии на незакрепленном слое», когда адсорбент не закрепляется на подложке; при этом элюирование приходится вести при горизонтальном или почти горизонтальном положении

пластинки. Смесь адсорбента со связующим наносят на подложку в виде тонкой суспензии и избыточный растворитель удаляют. Условия, при которых проводится удаление растворителя, зависят от адсорбента, связующего и желаемой адсорбционной активности. Точку старта на пластинке наносят на расстоянии 1,5 см от ее нижнего края, а финишную линию — на удобном расстоянии от стартовой точки. Это делают очень мягким свинцовым карандашом, стараясь не повредить слой адсорбента в точке нанесения пробы, поскольку это может привести к деформации пятен. При нанесении линии финиша целесообразно прорезать слой адсорбента до подложки таким образом, чтобы в слое образовалась хорошо заметная щель. Когда растворитель достигает финишной линии, прочерченной таким образом, проявление автоматически прекращается. Анализируемый раствор наносят на линию старта с помощью микропипетки и помещают пластинку в герметичный контейнер, на дно которого налит слой растворителя толщиной около 0,5 см. Растворитель поднимается по пластинке под действием капиллярных сил, пока не достигнет линии финиша, после чего пластинку извлекают из контейнера, дают растворителю испариться и устанавливают местоположение пятен различных соединений каким-либо методом, позволяющим сделать бесцветные пятна видимыми. Для этой цели применяют самые разные реактивы. В одних случаях проводят опрыскивание специфичными реактивами, например *o*-дианизидином для обнаружения альдегидов, в других — пластинки опрыскивают реактивами более общего назначения, например смесью серной кислоты с окислителем, применяемой для обнаружения большинства соединений [19]. Далее, измеряя расстояние между линией старта и центром пятна, находят величины R_f . В ТСХ величина R_f имеет тот же смысл, что и в бумажной хроматографии, и равна отношению длины пробега вещества к длине пробега растворителя. Последняя величина измеряется расстоянием между стартовой линией и фронтом растворителя. В некоторых случаях величину R_f относят к соответствующей величине, найденной для соединения, принятого за стандарт:

$$R_{st} = \frac{R_f \text{ вещества}}{R_f \text{ стандарта}}$$

Существует много вариантов описанного метода, в том числе проявление нисходящим потоком растворителя, многократное проявление, ступенчатое проявление и двумерная хроматография; все они рассматриваются ниже.

4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Теория колоночной адсорбционной хроматографии применима также и к ТСХ, поскольку пластинка с адсорбентом по сути дела представляет собой микролонку. В этой книге не дается математических выводов. Читателю, интересующемуся теоретическими вопросами, рекомендуется обратиться к статьям Вильсона [54], Де-Ваулта [55], Вейсса [56], Оффорда и Вейсса [57], Глюкауфа [58—60], Силлена [61], Бейля и Клинкаберга [62—64], Лендвега [65], Смита и ван дер Хёка [66, 67] Клеймера и Ван Кревельна [68], Диксона [69], Мак-Кворри [70], Таджа [71] и Снайдера [72—73]. Особый интерес представляют работы Патаки [74], Бреннера и Патаки [75], Беленького и сотр. [76], Диксона [77], Поллака [78], Рачинского [79], Рачинского и Давыдовой [80], Снайдера и Саундерса [81], Сочевинского [82, 83], Сочевинского и Голкевича [84, 85], Сочевинского и сотр. [86], Стюарта [87] и Турины и сотр. [88], которые посвящены непосредственно ТСХ.

Говоря коротко, адсорбция вещества из раствора твердой поверхностью происходит на поверхности раздела между твердой и жидкой фазами. В состоянии равновесия, когда число адсорбирующихся в единицу времени молекул равно числу десорбирующихся молекул, ситуацию можно выразить уравнением

$$a = c_a/c_s,$$

где a — коэффициент распределения, c_a и c_s — количества вещества, адсорбированного и находящегося в растворе соответственно. Равновесие зависит от температуры и концентрации раствора, но поскольку хроматографическое разделение проводится в практически адиабатических условиях, единственный фактор, который следует принимать во внимание, — это концентрация.

В общем случае коэффициент адсорбции нельзя считать постоянной величиной, поскольку он зависит от концентрации раствора. Если с разбавлением раствора адсорбция быстро возрастает, зависимость количества адсорбированного вещества от концентрации представляет собой параболическую кривую, причем коэффициент адсорбции при низких концентрациях практически постоянен. Чем больше наклон кривой, тем сильнее адсорбируется вещество и, следовательно, тем меньше скорость перемещения его по слою адсорбента потоком растворителя. Таким образом, скорость перемещения адсорбированного компонента (адсорбата) по хроматографической пластинке

зависит от «прочности» адсорбции и скорости потока элюирующего растворителя*.

После нанесения пробы на хроматографическую пластинку хроматограмму проявляют. Для этого заставляют растворитель двигаться по слою под действием капиллярных сил. При движении растворителя через пятно смеси адсорбированных веществ равновесие сдвигается и вещества десорбируются, причем более прочно адсорбированный компонент десорбируется в меньшей степени, чем менее прочно адсорбированный компонент. Десорбированный компонент переходит в раствор и переносится к краю пятна, где приходит в соприкосновение со свежим адсорбентом. При этом он вновь адсорбируется и устанавливаются новые равновесные условия. Таким образом, состав движущегося раствора непрерывно меняется вследствие распределения вещества между адсорбентом и растворителем.

Если на одном и том же участке адсорбента адсорбируются два соединения, то более прочно адсорбирующийся компонент вытесняет тот компонент, который адсорбируется менее прочно [89], в результате чего последний образует зону или пятно дальше от начала хроматограммы. Чем меньше разнятся коэффициенты адсорбции двух соединений, тем труднее их разделить; при некотором достаточно близком значении величин коэффициентов адсорбции разделение в данных условиях становится невозможным. (Принципы, на которых основано разделение с применением смешанных растворителей, рассмотрены в гл. III, разд. 5.)

Пятна на хроматограмме не всегда имеют круглую форму и четкие границы. Они могут диффундировать и расплываться равномерно во все стороны или в направлении движения (при этом степень расплывания может быть самой разной — от небольшой продолговатости до образования больших «хвостов» позади основного пятна). Это может объясняться нелинейностью изотермы адсорбции, чаще всего в тех случаях, когда адсорбция меняется с разбавлением раствора. Однако образование «хвостов» может иметь место и при линейной изотерме адсорбции. Для объяснения этого явления Гиддингс и Эйринг [90] предложили кинетический механизм, в соответствии с которым адсорбция в этих случаях происходит на активных центрах двух типов, причем число сильнее сорбирующих центров

* Линейная скорость перемещения адсорбата v вдоль пластинки в ТСХ, как и в других видах хроматографии, определяется уравнением

$$v = u/a,$$

где u — линейная скорость элюента (растворителя) в области данной хроматографической зоны, a — коэффициент распределения. — Прим. ред.

меньше. При обычном проявлении хроматограммы основная часть зоны при этом движется вперед, обгоняя ту часть вещества, которая адсорбируется на более активных центрах и медленнее десорбируется. В результате наблюдается образование «хвоста». Недавно Гиддингс [91] развил эту теорию более детально. Образование «хвостов» может происходить также при перегрузке хроматографического слоя.

Образование «хвостов» нежелательно, поскольку при этом возможно перекрывание зон или маскировка одной зоны другой. Этот эффект можно уменьшить, применяя градиентное элюирование, при котором полярность проявляющей смеси растворителей постепенно возрастает. В этом случае более полярный растворитель десорбирует «хвостовую» часть пятна и перемещает ее более быстро к фронту зоны. Однако необходимо следить за тем, чтобы полярность элюента не стала слишком большой, так как в этом случае другие прочнее сорбирующиеся вещества также могут десорбироваться, переместиться вперед и наложиться на пятна менее прочно сорбирующихся соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farradane J., Nature, 167, 120 (1951).
2. Reed L., Proc. Chem. Soc., 9, 123 (1893).
3. Schoenbein C. F., Verh. Naturforsch. Ges. Basel, 3, 249 (1861).
4. Goepfelsroeder F., Anregung zum Studium der auf Capillaritaets und Adsorptionerscheinungen beruhenden Capillaranalyse, Basel, 1906.
5. Goepfelsroeder F., Mitt. k. k. Tech. Gewerbemuseums Wein, N. S., 3, 14 (1889).
6. Goepfelsroeder F., Mit. k. k. Tech. Gewerbemuseums Wein, N. S., 2, 86 (1888).
7. Goepfelsroeder F., Verh. Naturforsch. Ges. Basel, 3, 268 (1861).
8. Tswett M., Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sect., 14, minute 6 (1903).
9. Brockmann H., Volpers F., Chem. Ber., 80, 77 (1947).
10. Sease J. W., J. Am. Chem. Soc., 69, 2242 (1947).
11. Ibid., 70, 3630 (1948).
12. Zechmeister L., Cholnoky L., Ujhelyi E., Bull. Soc. Chim. Biol., 18, 1885 (1936).
13. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 23, 428 (1951).
14. Martin A. J., Synge R. L. M., Biochem. J., 35, 1358 (1941).
15. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., 38, 225 (1944).
16. Fahmy A. R., Niederwieser A., Pataki G., Brenner M., Helv. Chim. Acta, 44, 2022 (1961).
17. Randerath K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 452 (1962).
18. Randerath K., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1, 435 (1962).
19. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
20. Reitsemma R. H., Anal. Chem., 26, 960 (1954).
21. Beyerinck M. W., Z. Phys. Chem., 3, 110 (1889).
22. Wijsman H. P., De Diastase, beschouwd als mengsel van Mattase en Dextrinase, Amsterdam, 1898.

23. Van Klinkenberg G. A., Chem. Weekbl., 63, 66 (1967).
24. Izmailov N. A., Schraiber M. S., Farmatsiya (Sofia), 1938, 1.
25. Lapp C., Erali K., Bull. Sci. Pharmacol., 47, 49 (1940).
26. Crowe M. O'l., Anal. Chem., 13, 845 (1941).
27. Békésy N. V., Biochem. Z., 312, 100 (1942).
28. Brown W. G., Nature 143, 377 (1939).
29. Williams T. L., Introduction to Chromatography, Blackie, Glasgow, 1947, p. 3.
30. Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949).
31. Kirchner J. G., Keller G. J., J. Am. Chem. Soc., 72, 1867 (1950).
32. Kirchner J. G., Miller J. M., Ind. Eng. Chem., 44, 318 (1952).
33. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 24, 1480 (1952).
34. Kirchner J. G., Miller J. M., J. Agric. Food Chem., 1, 512 (1953).
35. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 25, 1107 (1953).
36. Kirchner J. G., Miller J. M., Rice R. G., J. Agric. Food Chem., 2, 1031 (1954).
37. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 26, 2002 (1954).
38. Kirchner J. G., Miller J. M., J. Agric. Food Chem., 5, 283 (1957).
39. Zechmeister L., Cholnoky L., Principles and Practice of Chromatography, transl. from 2nd German ed. by A. L. Bacharach and F. A. Robinson, Wiley, New York, 1941, pp. 12, 13.
40. Mottier M., Potterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 118 (1952).
41. Ibid., p. 123.
42. Stahl E., Schroeter G., Kraft G., Renz R., Pharmazie, 11, 633 (1956).
43. Stahl E., Chem. Ztg., 82, 323 (1958).
44. Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Gasparič J., Eds., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1961—1965. Elsevier, Amsterdam, 1968.
45. Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Gasparič J., Rabek V., Churáček J., Eds., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1966—1969. Elsevier, Amsterdam, 1972.
46. Macek K., Hais I. M., Kopecký J., Schwarz S., Gasparič J., Churáček J., Eds., Bibliography of Paper and Thin-Layer Chromatography 1970—1973. Elsevier, Amsterdam, 1976.
47. Haywood B. J., Thin-Layer Chromatography: An Annotated Bibliography 1964—1968. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968.
48. Jaenchen D., Ed., CAMAG Bibliography Service, CAMAG, Muttenz, Switzerland (published quarterly).
49. Jaenchen D., Ed., Thin-Layer Chromatography, Cumulative Bibliography I 1964—1967. CAMAG, Muttenz, Switzerland, 1967.
50. Jaenchen D., Ed., Thin-Layer Chromatography, Cumulative Bibliography II 1967—1969. CAMAG, Muttenz, Switzerland, 1970.
- 50a. Jaenchen D., Ed., Thin-Layer Chromatography, Cumulative Bibliography III 1969—1973. CAMAG, Muttenz, Switzerland, 1974.
- 50b. Jaenchen D., Ed., Thin-Layer Chromatography, Cumulative Bibliography IV 1973—1977. CAMAG, Muttenz, Switzerland, 1977.
51. Scott R. M., Thin-Layer Chromatography Abstracts 1968—1971. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1972.
52. Scott R. M., Lundeen M., Thin-Layer Chromatography Abstracts 1971—1973. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1974.
53. Saxby M. J., Ed., Thin-Layer Chromatography Abstracts, D. H. Masek, England.
54. Wilson J. N., J. Am. Chem. Soc., 62, 1583 (1940).
55. DeVault D., J. Am. Chem. Soc., 65, 532 (1943).
56. Weiss J., J. Chem. Soc., 1943, 297.
57. Offord A. C., Weiss J., Dis. Faraday Soc., 7, 26, 45 (1949).
58. Glueckauf E., Proc. Roy. Soc. London Ser. A, 186, 35 (1946).
59. Glueckauf E., J. Chem. Soc., 1947, 1302.
60. Glueckauf E., Disc. Faraday Soc., 7, 12, 45 (1949).
61. Sillén L. G. Ark. Kemi, 2, 477 (1950).
62. Baylé G. G., Klinkenberg A., Rec. Trav. Chim., 73, 1073 (1954).
63. Ibid., 76, 593 (1957).
64. Ibid., p. 607.
65. Langvad T., Acta Chem. Scand., 10, 1649 (1956).
66. Smit W. M., van der Hoek A., Rec. Trav. Chim., 76, 561 (1957).
67. Ibid., p. 577.
68. Klamer K., Van Krevelen D. W., Chem. Eng. Sci., 7, 197 (1958).
69. Dixon H. B. F., J. Chromatogr., 7, 467 (1962).
70. McQuarrie D. A., J. Chem. Phys., 38, 437 (1963).
71. Tudge A. P., Can. J. Phys., 39, 1600 (1961).
72. Snyder L. R., J. Chromatogr., 23, 388 (1966).
73. Ibid., 25, 274 (1966).
74. Pataki G. P., Ph. D. dissertation, University of Basel, 1962.
75. Brenner M., Pataki G., Helv. Chim. Acta, 44, 1420 (1961).
76. Belenky B. G., Nesterov V. V., Gankina E. S., Smirnov M. M., J. Chromatogr., 31, 360 (1967).
77. Dixon H. B. F., J. Chromatogr., 7, 467 (1962).
78. Pollak V., J. Chromatogr., 77, 245 (1973).
79. Rachinskii V. V., "Theory of the Longitudinal Distribution of the Mobile Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography" in: Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography, K. Macek and T. M. Hais, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 284.
80. Rachinskii V. V., Davidova E. G. "Sorption Properties of Ion-Exchange Celluloses", in: Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography, Macek K., Hais I. M., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 111.
81. Snyder L. R., Saunders D. L., J. Chromatogr., 44, 1 (1969).
82. Soczewiński E., Adv. Chromatogr., 5, 3 (1968).
83. Soczewiński E., Anal. Chem., 41, 179 (1969).
84. Soczewiński E., Golkiewicz W., Chem. Anal. (Warsaw), 14, 465 (1969).
85. Soczewiński E., Golkiewicz W., Chromatographia, 6, 269 (1973).
86. Soczewiński E., Golkiewicz W., Szumilo H., J. Chromatogr., 45, 1 (1969).
87. Stewart G. H., Sep. Sci., 1, 747 (1966).
88. Turina S., Hovariš L., Marjanović V., J. Chromatogr., 37, 234 (1968).
89. Tiselius A., Ark. Kemi, Miner. Geol., 16A (18) (1943); Chem. Abstr., 38, 2895 (1944).
90. Giddings J. C., Eyring H., J. Phys. Chem., 59, 416 (1955).
91. Giddings J. C., Anal. Chem., 35, 1999 (1963).

ПРОДАЖНЫЕ АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. СИЛИКАГЕЛЬ ИЛИ КРЕМНЕВАЯ КИСЛОТА

Наибольшее распространение в качестве адсорбента в ТСХ получил силикагель. Впервые он был использован в этом методе Кирхнером и сотр. [1] в 1951 г. для разделения терпенов. Авторы испытали 15 различных адсорбентов и нашли, что наилучшие результаты дает кремневая кислота.

Адсорбенты для ТСХ выпускает ряд фирм и поставляет их как в чистом виде, так и с добавками связующего и флуоресцирующих агентов. Фирмы Merck и EM Laboratories выпускают несколько марок силикагеля. Цифры 60, 90 или 150, входящие в название марки силикагеля, обозначают средний диаметр пор в ангстремах, G обозначает добавку сульфата кальция (гипса) в качестве связующего, H—связующее на основе диоксида кремния и оксида алюминия, F—добавку флуоресцирующего агента, а подстрочная цифра—длину волны возбуждающего излучения. Буквой P обозначается адсорбент, предназначенный для препаративной ТСХ, R—адсорбент специальной очистки, RP—силанизированный гель для хроматографии с обращенной фазой.

Силикагель D5 выпускает фирма SAMAG; это очень мелкодисперсный гель, содержащий добавку сульфата кальция в качестве связующего. Такой же адсорбент, содержащий добавку неорганического флуоресцентного индикатора (для обнаружения адсорбированных веществ при УФ-облучении), называют силикагелем DF-5. Этот же адсорбент без добавки сульфата кальция выпускают под названием D0 и DF-0 (последний содержит добавку флуоресцирующего агента). Адсорбенты D0 и DF-0 прилипают к стеклу и без связующего, но образуют довольно мягкий слой. Как и у других мелкодисперсных адсорбентов без связующего, его способность прилипать к стеклу со временем постепенно ослабевает, поэтому его нельзя хранить очень долго. SAMAG выпускает также силикагели марки DS, свойства которых аналогичны свойствам упомянутой выше серии D, но скорость движения растворителя и компонентов по адсорбентам серии DS больше вследствие несколько больших размеров частиц.

Фирма M. Woelm изготавливает силикагель с частицами размером меньше 50 мкм и с рН, близким к нейтральному. Его

выпускают как в чистом виде, так и с добавками связующего (сульфата кальция) и флуоресцирующего агента.

Фирма Macherey, Nagel and Co. производит силикагели двух типов—стандартного качества и повышенной очистки. Оба типа силикагелей выпускают в виде ряда модификаций. Маркировка G означает добавку связующего (сульфата кальция), N означает, что связующее отсутствует, а S—что в качестве связующего добавлен крахмал. Буквы HR показывают, что смесь содержит силикагель высокой чистоты, а буквы UV—что в смесь добавлено вещество, флуоресцирующее при УФ-облучении. Например, силикагель марки «MN-силикагель G-HR/UV»—это смесь, выпущенная фирмой Macherey, Nagel и содержащая силикагель высокой чистоты с добавкой связующего (сульфата кальция) и флуоресцирующего агента.

В США фирма Applied Science Laboratories выпускает силикагель, содержащий 10% сульфата кальция в качестве связующего. Размер частиц этого силикагеля колеблется в интервале 10—20 мкм, реакция адсорбента кислая. Фирменное название—адсорбосил-1. Тот же силикагель без связующего называется адсорбосил-2. Адсорбосил-S-1—кислый адсорбент с частицами размером 300—400 меш с сильно выраженными свойствами кремневой кислоты, содержащий добавку связующего. Без связующего этот же адсорбент выпускается под маркой адсорбосил-S-2. Адсорбосил-P-1 представляет собой силикагель с добавкой неорганического фосфора и крахмала в качестве связующего. Тот же адсорбент без добавки крахмала выпускается под названием адсорбосил-P-2. Адсорбосилы ADP-1 и ADP-2 содержат неорганический фосфор и флуоресцеин; ADP-1 содержит также крахмал, а ADP-2 связующего не содержит.

Адсорбосил-3 содержит 10% силиката магния. Адсорбосил-4 представляет собой силикагель высокой чистоты, промытый кислотой, нейтрализованный, промытый органическим растворителем и смешанный с 10% силиката магния. Адсорбосил-5—силикагель без связующего с рН 6,8—7. Адсорбосил-ADN-1 содержит 25% нитрата серебра и 10% сульфата кальция, а ADN-2 сульфата кальция не содержит. Эта же фирма выпускает также реверсил-3—силикагель, обработанный диметилдихлорсиланом. Он не смачивается полярными растворителями, поэтому его можно использовать для распределительной хроматографии с обращенной фазой. Этот силикагель диспергируют в относительно высококипящем неполярном растворителе.

Фирма Schleicher and Schuell производит адсорбент под названием силикагель-150. Он также выпускается в нескольких

модификациях — с добавкой 15 % гипса или крахмала и без них, а также с флуоресцирующей добавкой.

Фирма J. T. Baker выпускает нейтральный силикагель с добавками сульфата кальция и флуоресцирующего агента и без них.

Фирма Mallinkrodt выпускает два типа адсорбентов на основе силикагеля. Silic AR TLC-4 (кодировый номер 7097) представляет собой кислый продукт (10 %-ная суспензия с pH 4—5,5) с максимальным содержанием железа 0,003 % и максимальным содержанием тяжелых металлов (например, свинца) не более 0,004 % (согласно спецификации). Silic AR TLC-7 (кодировый номер 7102) имеет pH от 6,5 до 7,2, такое же содержание тяжелых металлов и содержит не более 0,004 % железа. Оба эти адсорбента выпускаются также с добавкой 15 % связующего (сульфата кальция) или 6 % неорганического фосфора, а также с обеими добавками. В этих случаях они дополнительно маркируются соответственно буквами G, F или GF. В качестве фосфора используется неорганический галоапатит, характеризующийся яркой белой флуоресценцией. Размер зерен этих адсорбентов лежит в интервале 2—15 мкм.

Фирма Bio-Rad Laboratories выпускает силикагели с размером зерен 1—10, 10—30 и 30—60 мкм с добавкой или без добавки связующего (сульфата кальция) и флуоресцирующего агента (силиката цинка).

Фирма Whatman выпускает для ТСХ силикагель марки SG41. Средний размер зерен лежит в пределах от 5 до 20 мкм, максимальный равен 60 мкм. Содержание железа не превышает 0,014 %, содержание хлорида 0,01 %. 10 %-ная водная суспензия этого адсорбента имеет pH 7.

Фирма Analabs производит адсорбент на основе диоксида кремния с добавкой сульфата кальция (анасил В) и без нее (анасил S).

2. ОКСИД АЛЮМИНИЯ

Оксид алюминия давно применяется в колоночной хроматографии; по распространенности в ТСХ он занимает второе место после силикагеля. Хроматографию на свободном слое адсорбента чаще всего проводят именно на оксиде алюминия. Оксид алюминия, специально предназначенный для тонкослойной хроматографии, также имеется в продаже. Фирма SAMAG выпускает несколько марок этого адсорбента под общим названием «оксид алюминия для тонкослойной хроматографии». Цифровые и буквенные обозначения этой серии аналогичны тем, которые используются для силикагелей. Например, буквой D маркируется тонкодисперсный оксид алюминия, а бук-

вами DS — оксид алюминия с более крупным зерном, на котором разделение происходит быстрее. Буквой F маркируется адсорбент с добавкой флуоресцентного индикатора. Цифра 0 означает, что адсорбент не содержит связующего, цифра 5 — что он содержит 5 % сульфата кальция (алебаstra) в качестве связующего. Адсорбент имеет основной характер (pH около 9).

Фирмы Merck и связанная с нею EM Laboratories поставляют ряд модификаций оксида алюминия, аналогичных выпускаемым ими модификациям силикагеля, в том числе несколько марок нейтрального, кислого и основного оксида алюминия.

Фирма Woelm производит основной, нейтральный и кислый оксид алюминия для ТСХ. Эти адсорбенты представляют собой мелкозернистые порошки без добавки связующего; pH их соответственно равен 9, 7,5 и 4. Кроме того, выпускается также оксид алюминия с добавкой 10 % связующего (сульфата кальция).

Фирма Bio-Rad выпускает три марки оксида алюминия — кислый (AG4), нейтральный (AG7) и основной (AG10) с добавкой 5 % сульфата кальция или без нее.

Менгольд [2] использовал активированный оксид алюминия фирмы Alcoa (20 меш) с добавкой 5 % алебаstra.

3. ДИАТОМИТОВАЯ ЗЕМЛЯ

Фирма Merck выпускает для ТСХ диатомитовую землю (кизельгур G) со средним размером зерна 10 мкм; связующим служит сульфат кальция. Кизельгур G используется главным образом в распределительной хроматографии, поэтому его пропитывают гидрофильными или гидрофобными жидкими фазами.

Выпускаемая фирмой Johns Manville диатомитовая земля (целит 545) также с успехом применяется в тонкослойной хроматографии.

4. СИЛИКАТ МАГНИЯ

Силикат магния, выпускаемый для ТСХ фирмой Woelm, имеет pH около 10. Рекомендуется готовить суспензию, содержащую около 15 г силиката магния на 45 мл воды. Нанесенный слой высушивают на воздухе, после чего активируют примерно при 130°С.

Фирма Applied Science производит специально для ТСХ две модификации адсорбента на основе силиката магния: адсорбосил-М-1 (ADM-1) и адсорбосил-М-2 (ADM-2). Первый из них содержит сульфат кальция в качестве связующего.

Фирма Bio-Rad выпускает для ТСХ силикат магния марки М-1 с зернами размером от 2 до 44 мкм. Этот адсорбент

также поставляется в двух модификациях — с добавкой связующего и без нее.

Фирма Floridin поставляет активированный силикат магния с частицами различного размера. Наиболее пригодна для ТСХ фракция с частицами размером 100—200 меш, менее 100 меш и менее 200 меш.

5. ПРОЧИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ АДСОРБЕНТЫ

Как впервые показали Кирхнер и сотр. [1], практически любой адсорбент, применяемый в колоночной хроматографии, можно использовать также и в ТСХ, если измельчить его и (или) отсеять частицы подходящего размера. Можно получить тонкие слои талька, гидроксида, фосфата и сульфата кальция, карбонатов цинка, кальция и магния. Во всех случаях за исходные можно брать продажные препараты. Большинство из них можно получить в виде реактивов марки ч. д. а.

Фирма Applied Science выпускает измельченное пористое стекло адсорбосил-G-1 и адсорбосил-G-2 соответственно с добавкой гипса и без него. Фирма Bio-Rad выпускает для тонкослойной хроматографии пять марок порошка пористого стекла с частицами размером порядка 200 меш.

Оксиапатит, применявшийся для тонкослойной хроматографии Гофманом [3, 4], в настоящее время продается в виде суспензии в фосфатном буферном растворе под названием гипатит (Clarkson Chemical Co.). По Гофману [5], для получения удовлетворительного адсорбента оксиапатит можно промыть водой, спиртом, ацетоном и высушить. Разумеется, для получения фракции с нужным размером частиц его необходимо просеять.

Фирма Bio-Rad производит порошок оксиапатита для ТСХ под названием био-гель НТР.

6. ЦЕЛЛЮЛОЗА И МОДИФИЦИРОВАННАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА

Поскольку бумага сыграла большую роль в хроматографии аминокислот и других соединений, не удивительно, что некоторые исследователи попытались использовать тонкие слои целлюлозы для тех же целей. Результаты были вполне удовлетворительными. Оказалось, что разделение на тонких слоях целлюлозы происходит быстрее и лучше, чем на бумаге. С целлюлозой можно работать без связующего, поскольку она имеет волокнистую структуру, хотя в некоторых случаях его все же используют. В табл. 2.1 приведены различные типы целлюлозных адсорбентов для ТСХ, выпускаемые разными фирмами.

Таблица 2.1

Целлюлоза и модифицированная целлюлоза, специально предназначенные для ТСХ

Фирма-поставщик ^a	Марка	Характеристика
CAMAG	Целлюлозный порошок CAMAG, тип D-0	Чистая целлюлоза без связующего
	Целлюлозный порошок CAMAG, тип DF-0	Целлюлоза без связующего с добавкой флуоресцирующего агента
Whatman	Whatman, кристаллический целлюлозный порошок CC41	Целлюлозный порошок без связующего, средний размер частиц 200 меш. Препарат высокой чистоты содержит не более 0,01 % золы, $5 \cdot 10^{-4}$ % железа, $5 \cdot 10^{-4}$ % меди
Schleicher and Schuell	Целлюлозный порошок № 65	Чистая целлюлоза
	Целлюлоза DEAE № 66	Диэтиламиноэтилцеллюлоза
	Целлюлоза ECTEOLA № 67	Анионообменник, полученный по реакции эпихлоргидрина и триэтанолamina с целлюлозой
	Селектасель CM № 68	Катионообменник на основе карбоксиметилцеллюлозы
	Селектасель P № 69	Катионообменник на основе фосфорилированной целлюлозы
	Целлюлоза 144dg	Целлюлозный порошок, дважды промытый кислотой
	Целлюлоза 144	Очень чистый мелкозернистый целлюлозный порошок
Macherey	Целлюлоза 144LS 254	Целлюлоза с добавкой 3 % флуоресцирующего агента
	Целлюлоза 144/ac	Ацетилированная целлюлоза. Различные модификации содержат 6, 21 и 41 % ацетильных групп
	MN 300	Чистая целлюлоза

Фирма-поставщик ^a	Марка	Характеристика
Nagel and Co.	MN 300 UV	Целлюлоза с флуоресцентной добавкой (активированным силикатом цинка)
	MN 300 HR	Целлюлоза особой очистки
	MN 30 Ac	Ацетилованная целлюлоза (изготавливается целлюлоза, содержащая 10, 20, 30 или 40 % ацетильных групп)
	MN 300 CM	Карбоксиметилцеллюлоза
	MN 300 P	Фосфорилированная целлюлоза
	MN 300 DEAE	Диэтиламиноэтилцеллюлоза (анионообменник)
	MN 300 ECTEOLA	Анионообменник
	MN 300 PEI	Полиэтилениминцеллюлоза (анионообменник)
	MN 300 Poly-P	Полифосфат целлюлозы (катионообменник)
Bio-Rad Laboratories	Целекс D (DEAE)	Диэтиламиноцеллюлоза
	Целекс E (ECTEOLA)	ECTEOLA-целлюлоза
	Целекс PEI	Полиэтилениминцеллюлоза
	Целекс CM	Карбоксиметилцеллюлоза
	Целекс P	Фосфорилированная целлюлоза
	Целекс N-1	Целлюлозный порошок
	Целекс MX	Микрокристаллическая целлюлоза
Serva-Entwicklungslabor Co.	Serva CM-TLC-целлюлоза	Карбоксиметилцеллюлоза
	Serva-целлюлоза TLC	Целлюлоза
	Serva DEAE-TLC	Целлюлоза DEAE
	Serva ECTEOLA-TLC	ECTEOLA-целлюлоза
	Serva PEI-TLC	Полиэтилениминцеллюлоза

Фирма-поставщик ^a	Марка	Характеристика
Avicel Sales Division, American Viscose, Div. FMC	Avicel	Микрокристаллическая целлюлоза

^a Адреса фирм-изготовителей и поставщиков перечислены в приложении Б (т. 2).

7. ИОНООБМЕННЫЕ СМОЛЫ

Фирма Bio-Rad изготавливает ряд ионообменных материалов специально для ТСХ. Под названием AG50W-X8 и AG1-X8 выпускают соответственно катионо- и анионообменные смолы в виде сферических частиц размером 200—400 меш с добавкой сульфата кальция в качестве связующего; диаметр сферических частиц этих смол составляет 200—400 меш. Эти же смолы выпускают также в виде гранул размером 2—44 мкм без добавки связующего.

Та же фирма поставляет также фосфат циркония (био-рад ZP-1), вольфрамат циркония (био-рад ZT-1), молибдат циркония (био-рад ZM-1), гидратированный оксид циркония (био-рад HZO-1) и молибдофосфат аммония (био-рад AMP-1). Последний изготавливают в виде порошка с частицами размером 2—10 мкм, а остальные — с частицами размером 2—44 мкм. Эти неорганические соединения используются в ТСХ в качестве ионообменников с добавкой 3 % крахмала в качестве связующего [6].

8. ПРОЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ АДСОРБЕНТЫ

В настоящее время в ТСХ нашли лишь ограниченное применение всего несколько типов органических материалов. Однако можно ожидать, что они сыграют более важную роль в будущем.

Полиамиды

Полиамидные порошки для ТСХ производят три фирмы: Macherey, Nagel & Co., M. Woelm Co. и E. Merck A. G. Все эти порошки не содержат связующего. Для нанесения тонкого слоя готовят суспензии 5 г порошка в 45 мл этанола.

Ряд фирм поставляет полиамиды для ТСХ. Фирмы Macherey, Nagel & Co. выпускают полиамид 6,66 и 11 в трех модификациях: чистый полиамид, полиамид с флуоресцирующей добавкой и ацетилированный полиамид. Фирмы M. Woelm, E. Merck, J. T. Baker и Wako Pure Chemical Ltd. также производят полиамиды для ТСХ.

Материалы для гель-фильтрации

Фармацевтическая промышленность выпускает сшитые декстриновые гели различных марок и модификаций под названием сефадекс. Они используются в колоночной хроматографии для разделения веществ по молекулярным массам. Специально для ТСХ выпускаются сефадексы G-25, G-50, G-75, G-100, G-150 и G-200. Все это высоко чистые продукты с частицами размером 10—40 мкм. На таких гелях можно разделять молекулы различных размеров. Фирма Bio-Rad Laboratories производит для ТСХ полиакриламидные гели P-2, P-4, P-10, P-30, P-60, P-100, P-150, P-200 и P-300 со сферическими частицами размером 400 меш.

Полиэтилен

Фирма Farbwerke Hoechst выпускает полиэтиленовый порошок под названием гостален S. Менгольд [2] проводил на этом порошке разделение методом ТСХ жирных кислот и их метиловых эфиров.

9. ПРОДАЖНЫЕ ГОТОВЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПЛАСТИНКИ

Фирма Analtech предлагает хроматографистам готовые для использования покрытые адсорбентом стеклянные пластинки. На эти пластинки, так называемые «униплаты», нанесены тонкие слои разных адсорбентов как со связующим, так и без него. Выпускаются также покрытые адсорбентом пластинки с нанесенными на них продольными рисками. После проявления серии хроматограмм на одной пластинке их можно разделить, отламывая полоски стекла одну за другой. Кроме того, фирмы изготавливают тонкослойные платы по специальным заказам. Большинство фирм, поставляющих адсорбенты для ТСХ, в настоящее время выпускают также стеклянные пластинки и (или) листки фольги с нанесенными на них адсорбентами. В настоящее время выпускаются готовые пластинки практически со всеми более или менее распространенными адсорбентами, которые производятся данной фирмой. Помимо обычных адсорбентов фирма Eastman Kodak производит также поликарбонат, нанесенный на

полиэфирную пленку. Фирма Pharmacia изготавливает пластинки из градиентного полиакриламидного геля толщиной 2,7 мм.

В обзоре Масака и Бекваровой [7] перечислены все фирмы, выпускающие готовые пластинки и гибкие пленки для ТСХ, а также хроматографическую бумагу. В этом обзоре указаны специальные характеристики выпускаемых пластинок, наличие или отсутствие связующего в адсорбенте, а также их размеры.

Фирма Applied Science в течение некоторого времени (1962 г.) выпускала также листы стекловолна, пропитанные силикатом калия или кремневой кислотой. Gelman Instrument Co. также выпускает «листы стекловолна, пропитанные силикатом калия» под названием ITLC (быстрая тонкослойная хроматография). Фирма Mallinckrodt производит пропитанную кремневой кислотой стеклоткань толщиной 500 и 1000 мкм в виде рулонов. Размер листа стеклоткани в рулоне равен 20×200 см.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
2. Mangold H. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 708 (1961).
3. Hofmann A. F., J. Lipid Res., 3, 319 (1962).
4. Hofmann A. F., Biochim. Biophys. Acta, 60, 458 (1962).
5. Hofmann A. F., "Hydroxyapatite as an Adsorbent for Thin-Layer Chromatography; Separations of Lipids and Proteins" in: New Biochemical Separations, A. T. James and L. J. Morris, Eds., Van Nostrand, New York, 1964, p. 283.
6. Zabin B. A., Rollins C. B., J. Chromatogr., 14, 534 (1964).
7. Macek K., Bečvarová H., Chromatogr. Rev., 15, 1 (1971).

1. ПОДЛОЖКА

Ввиду высокой химической инертности стекло является универсальной подложкой для тонкослойной хроматографии. Поэтому стеклянные пластинки различных размеров, формы и толщины использовались и используются для этой цели. Мейнхард и Холл [1] проводили хроматографирование на предметных стеклах микроскопа. Кирхнер и сотр. [2] применяли узкие стеклянные пластинки стандартного размера (1,2×13 см), которые можно поместить в обычные пробирки. Это позволило свести к минимуму размеры камеры для разделения и добиться быстрого установления равновесия между растворителем и его паром. Для двумерной хроматографии те же авторы предложили пластинки стандартного размера 13×13 см. Такая пластинка помещается в стандартную банку, используемую для консервирования препаратов и образцов в музеях. На рекомендованных Кирхнером и сотрудниками пластинок можно получать хроматограммы длиной до 10 см. Эта длина была принята за оптимальную, поскольку она позволяет добиться достаточно хорошего разделения смесей за сравнительно непродолжительное время. Кроме того, на хроматограммах таких размеров можно определять значения R_f , проводя измерения в миллиметрах. Фирмы, производящие оборудование для ТСХ, выпускают стеклянные пластинки размерами 200×200, 200×400, 200×100 и 200×50 мм. (При использовании пластинок размером 200 мм для получения хроматограммы длиной 10 см тратится впустую около трети адсорбента.) В тех случаях, когда для обнаружения разделенных веществ нужен нагрев до высокой температуры, используют пластинки из пирекса. Однако из-за особенностей технологии производства таких пластин они не столь однородны по толщине, как пластинки из обычного стекла.

В 1962 г. три исследователя (Гофман [3], Пейфер [4] и Уосики [5]) независимо друг от друга вновь стали проводить разделение методом ТСХ на предметных стеклах. В отличие от Мейнхарда и Холла, применявших радиальное разделение, эти исследователи использовали метод разделения восходящим током растворителя, предложенный Кирхнером и сотр. [2]. Пейфер и Гофман осуществляли хроматографирование на

небольших квадратных пластинках, Пейфер — на стеклянных пластинках для диапроектора размером 10,3×8,3 см, а Гофман — на квадратных пластинках размером 66×66 мм. Пейфер, кроме того, применял для серийных анализов покровные стекла размером 4,2×2,5 см. На таких пластинках разделение проходит довольно быстро, поэтому они применялись многими исследователями [6—17], однако малая длина ограничивает их разделяющую способность. Другой предельный вариант пластинки — большие пластинки, предназначенные для препаративной ТСХ. Так, Корзун и сотр. [18] пользовались пластинками размером 30×37,5 см, Халпаап [19] — пластинками размером 20×100 см. Фирма Shandon Scientific Co. выпускает для препаративных целей платы размером 100×200 см.

Адсорбенты лучше наносить на стекло, поверхность которого обработана абразивом или пескоструйным аппаратом, особенно если работа ведется с водными растворами. Ригби и Бетюн [20] первыми использовали в качестве подложек в ТСХ стеклянные пластинки, обработанные пескоструйным аппаратом, позднее их примеру последовали и другие хроматографисты [21—32]. Такого же результата можно добиться, если отшлифовать поверхность стекла водной суспензией карборунда. Дополнительное преимущество такой пластинки состоит в том, что при шлифовке поверхность ее становится более ровной, так как снимаются мелкие неровности. Зачищенная поверхность обеспечивает лучшую адгезию слоя адсорбента. Кроме того, если адсорбент смывается с поверхности платы в том месте, где ее погружают в растворитель, то последний все равно поднимается по капиллярам, образованным на поверхности платы при шлифовке, и, таким образом, достигает оставшейся на пластинке рабочей части слоя адсорбента. Если для обнаружения пятен разделенных компонентов пластинку опрыскивают серной кислотой и нагревают, то на зачищенных пластинках наблюдается меньшая тенденция к образованию пузырьков в слое [23, 33]. Клапп и Джетер [34] разными способами пытались предотвратить смывание адсорбента с платы. Они использовали «сэндвичевые платы» фирмы SAMAG, у которых со всех четырех краев (а не с трех, как обычно) было удалено по 8 мм адсорбента. Покрывали нижнюю сторону платы тремя или четырьмя полосками промытой и высушенной фильтровальной бумаги, которые накладывали на адсорбент. Если покрывающую плату закрепить с помощью зажима, то бумага препятствует смыванию адсорбента и служит в качестве фитиля для подачи растворителя.

Гемп и сотр. [35] пытались проводить хроматографирование на пластинках из рифленого декоративного стекла. Из такого стекла можно получить тонкие полоски для ТСХ без специальных приспособлений. Суспензию наносят на рифленое стекло

обычным пульверизатором, выдерживают 1—2 мин и шпателем удаляют излишек адсорбента. После высушивания проводят шпателем вдоль рифления еще раз, чтобы удалить лишний адсорбент. В результате получают ряд узких полосок адсорбента, разделенных стеклянными перегородками. Однако в этом случае не удается приготовить достаточно ровные слои. Разумеется, такие пластинки непригодны для двумерной хроматографии. Хенсбюри и сотр. [36] сами изготовляли пластинки с продольными желобками. Для этого те части пластинки, которые нужно было покрыть адсорбентом, заклеивали изоляционной лентой. Оставшиеся части пластинки покрывали глицеральным лаком (Gepal Electric № 1202), высушивали, удаляли изоляционную ленту и выдерживали пластинки при комнатной температуре $7\frac{1}{4}$ ч в растворе, содержащем 114 г бифторида аммония на 1 л воды. Во время травления раствор перемешивали. Затем промывали пластинки водой и удаляли лак. По окончании описанной процедуры на пластинках образовывались ровные канавки глубиной 0,3 мм. Поверхность их получалась шероховатой, что обеспечивало хорошее удерживание слоя адсорбента. Этим методом можно также изготавливать квадратные пластинки для двумерной хроматографии.

Метерн и Беталер [37] использовали для очистки проб при газохроматографическом определении пестицидных остатков пластинки размером $10 \times 2 \times 200$ мм с углублениями. Углубления располагались на пластинке на расстоянии 6 мм. Коллинз [38] применял пластинки с углублением, расположенным в поперечном направлении у края пластинки. Благодаря этому слой адсорбента в начале хроматограммы был более толстым, и очистку можно было проводить, как обычное хроматографическое разделение. В точку старта можно было наносить в десять раз больше экстракта, чем обычно. С помощью летучего растворителя подвижные компоненты перемещали в новую стартовую точку, лежащую выше углубления, тогда как белки оставались на прежнем месте. Такие пластинки в настоящее время выпускает фирма May and Baker.

Бойд и Хаттон [39] исследовали пригодность кварцевых пластинок в качестве подложек для тонкого слоя кремневой кислоты, с тем чтобы рассматривать полученные хроматограммы в проходящем УФ-свете. Однако оказалось, что слой кремневой кислоты настолько сильно поглощает, что пятна на хроматограмме мало отличаются от фона. Поэтому авторы [39] отказались от кварцевых пластинок и вернулись к стеклянным пластинкам. Вейнер и Зак [40] использовали кварцевые пластинки при оценке оптической плотности пятен, видимых при УФ-облучении на тонких слоях агар-агара, применяемых в электрофрезе. Аррегуин [41] применил в качестве подложки для DEAE-цел-

люлозы при разделении нуклеотидов стеклянные фильтры № 7910 и CS № 9,54 фирмы Corning, которые хорошо пропускают свет в интервале 250—400 нм.

Сквиб [42] наносил тонкие слои силикагеля на матовую поверхность пластиковой пластинки, другая сторона которой была гладкой. После получения хроматограммы и обнаружения пятен слой опрыскивали реактивом «Таффилм спрей» № 543 фирмы Grumbacher. Реактив проникал в слой силикагеля и связывал его с пластинкой, которую разрезали на полоски и пропускали через стандартное сканирующее устройство для измерения радиоактивности пятен. Пластинки были изготовлены из пластика VCA 3310-C1 фирмы Union Carbide. Марш и сотр. [43] применяли в качестве пластинок для ТСХ пластиковые кюветы для электрофореза.

Первое упоминание о тонких пластиковых листах как о носителях адсорбента в ТСХ относится к 1964 г. [44]. Вскоре после этого готовые для использования хроматографические материалы такого типа начали в большом количестве производиться многими фирмами. Эти листы удобны тем, что легко режутся ножницами, и поэтому из них можно вырезать пластинку любого размера. Однако емкость слоя адсорбента на таком листе обычно несколько меньше, чем на стекле. Такие листы (20×500 см) выпускаются в виде рулонов [45]. Халлаап и Бауш [46] получали на них хроматограммы длиной до 1 м. Рёсслер и сотр. [47] запатентовали метод покрытия пластиковых листов диоксидом титана или циркония перед нанесением адсорбента. Такая обработка препятствует диффузии пластификаторов и других веществ из пластика в адсорбент. Тонкие пластиковые листы рекомендованы в качестве подложки для геля в тонкослойном электрофорезе, позволяющей устранить искажение профиля зоны, происходящее в толстых слоях, и избежать необходимости делать срезы геля. Для этой цели использовалась также покрытая тефлоном стеклянная бумага [40].

В работе Шведы [52] сравниваются характеристики стеклянных пластинок и полиэфирных листов, покрытых силикагелем. Оказалось, что в некоторых случаях лучшие результаты получались на пластинках, а в других — на пластиковых листах.

Снайдер [53] описал применение алюминиевых пластинок толщиной 4 мм в качестве подложек в ТСХ. Он установил, что такие пластинки необходимо тщательно полировать и затем промывать водой. Адсорбент наносился на пластинки в виде 47% -ной суспензии в этиловом спирте (спирт служил смачивающим агентом). (При нанесении слоя на край шпателя приклеивали полоску липкой ленты, чтобы не поцарапать поверхность алюминия.) Проводя обнаружение разделенных компонентов, такие пластинки можно класть непосредственно на горячую электри-

ческую плитку, тогда как стеклянные пластинки при этом могут лопнуть. Корзун и Броди [54], а также Росмус и сотр. [55] использовали алюминиевые подложки для центрифужной ТСХ, а Рейбенорт [56] и Косс и Джерхель [57] применили алюминиевую фольгу как подложку в хроматографии с нисходящим потоком растворителя. В качестве подложек применялись также тонкие полоски из нержавеющей стали [58], никелевой бронзы [59] и латуни, покрытой толстым слоем хрома [60]. Подложки из нержавеющей стали вырезали из ленты толщиной 0,125 мм и зачищали поверхность грубой наждачной бумагой для улучшения адгезии адсорбента.

Ли и Най [61] покрывали тонким слоем адсорбентов внутреннюю поверхность пробирок. Для этого пробирки наполняли суспензией адсорбента, которую затем выливали, и высушивали пробирки в перевернутом положении. Такие покрытые адсорбентом пробирки служили проявительными камерами. Для обнаружения пятен применяли пары иода. Разумеется, применять опрыскивание в этом случае трудно. Кроме того, поскольку рассматривать хроматограмму приходится сквозь стекло с нижней стороны слоя, чувствительность этого метода ниже, чем при применении обычных плоских пластинок, так как концентрация разделенных веществ выше на поверхности слоя [62]. Авторы работ [63—66] проводили хроматографирование на цилиндрических трубках, покрытых слоем адсорбента изнутри. Этот метод разделения имеет те же недостатки, что и метод разделения на пробирках. Единственное отличие состоит в том, что трубки открыты с обоих концов и что можно взять трубку большего диаметра, чем пробирка. Икан и Рапопорт [67] наносили слой на внешнюю поверхность пробирки. В этом случае опрыскивание, рассмотрение хроматограммы и извлечение пятен значительно облегчается.

В качестве подложек использовались также стеклянные прутки различного диаметра [67—70]. Адсорбент на эти прутки наносили, погружая их в суспензию, а хроматограммы проявляли в пробирках. Такие прутки удобны для проверки пригодности различных смесей растворителей.

Сен [71, 72] изготавливал прутки из сульфата кальция без всякой подложки. Он формовал прутки диаметром 6—8 мм из смеси осажденного из раствора сульфата кальция ($\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) и алебаstra, смоченного водой (55:44). После осторожного высушивания и активации прутки могли выполнять роль микроколонок, причем проявление хроматограмм проводили в обычных пробирках.

В качестве подложек для тонкослойной хроматографии использовали также стеклянные усеченные пирамиды. Однако в этом случае мы фактически имеем дело с вариантом круговой

хроматографии, причем и адсорбент и пробу наносить в этих условиях сложнее.

2. АДСОРБЕНТ

В разд. 4 данной главы описаны поставляемые фирмами готовые адсорбенты, в том числе адсорбенты, специально предназначенные для ТСХ. Настоящая глава представляет интерес для тех исследователей, которые намереваются изготовлять адсорбенты самостоятельно. В ней описаны адсорбенты, пригодные для решения различных конкретных задач ТСХ, и рассмотрены некоторые способы придания им желательных характеристик. Так, в разделе, посвященном приготовлению суспензий, приводятся все используемые при этом приемы, например буферирование.

Кремневая кислота или силикагель

Термины «силикагель» и «кремневая кислота» относятся к несколько различным модификациям одного и того же материала. Этот вопрос хорошо освещен в работе Рена [75]. Сравнительные исследования разделения, проведенные методом колоночной хроматографии рядом авторов, показали, что кремневая кислота — более активный адсорбент [76—84].

Кирхнер и сотр. [2] проводили разделение на кремневой кислоте фирмы Мегк, просеянной для удаления частиц размером больше 100 меш. Согласно паспортным данным, этот реактив содержит не более 0,001 % железа и 0,003 % тяжелых металлов, например свинца. Эплуайт и сотр. [85, 86]. Беттайл и сотр. [87], Димоул [88], Куроива и Хашимото [89], Гейуорд и сотр. [90] и Ониши и сотр. [91] использовали для хроматографического анализа кремневую кислоту фирмы Mallinkrodt (№ 2847, 100 меш). Этот препарат, согласно спецификации, содержит не более 0,001 % железа и не более 0,002 % тяжелых металлов. Фогель и сотр. [92], Донзаки и Зив [93] и Эйвиген и сотр. [94] также проводили хроматографирование на этой кремневой кислоте, однако в первых двух работах отсеивали фракции ≤ 200 меш, а в последней отсеивали фракцию ≤ 325 меш. Все три группы авторов нашли, что разделение на кремневой кислоте фирмы Mallinkrodt дает лучшие результаты, чем разделение на силикагеле G. Рейтсема [95] и Аллентоф и Райт [21] применяли осажденную кремневую кислоту марки ч. д. а. фирмы Fisher.

Для тех, кто желает получить силикагель самостоятельно, Ададек и сотр. [96] предлагают следующую методику. Растворимый силикат натрия разбавляют водой в соотношении 1:2 и добавляют концентрированную соляную кислоту до pH 5. При

этом осаждается гель. Полученную смесь высушивают в течение трех дней при 80°C с тем, чтобы придать гелю зернистую структуру. После этого гель отмывают на воронке Бюхнера от хлорида, экстрагируют хлороформом в течение 8 ч в аппарате Сокслета, высушивают, измельчают в шаровой мельнице и рассеивают на фракции. При высушивании силикагеля температура не должна превышать 170°C, поскольку при более высоких температурах происходит необратимая потеря воды и адсорбционные характеристики продукта постепенно ухудшаются.

Шукла и сотр. [97] получали силикагель, смешивая 19 %-ный горячий раствор силиката натрия с равным объемом 10 %-ной соляной кислоты. Раствор перемешивали при 50—55°C (рН 1—1,5) и добавляли плавиковую кислоту из расчета 0,25 мл кислоты на 1 л раствора. Авторы [97] нашли, что добавка плавиковой кислоты значительно сокращает время образования геля. В то же время полученный продукт характеризуется высокой удельной поверхностью (811 м²/г) и повышенной адсорбционной способностью.

Не удивительно, что силикагели, выпускаемые различными фирмами, и даже разные партии силикагеля одной и той же фирмы имеют разную адсорбционную активность. Из приведенных ниже примеров видно, что эффективность разделения зависит от размера зерен, удельной поверхности, размера пор и от содержания влаги в препарате. Так, Петровой [98] удавалось разделять некоторые антибиотики только на адсорбенте с зернами размером меньше 20 мкм, а Ваксмундски и Разило [99] показали, что изомерные оксинафталины нельзя разделить на силикагеле с удельной поверхностью меньше 565 м²/г.

Гертнер и Грисбах [100] нашли, что удельная поверхность и структура пор силикагеля зависят от концентрации исходного золя и рН. Максимальные удельные поверхности удается получить при средних концентрациях и средних значениях рН. Тарутани [101] исследовал поведение кремневой кислоты на колонках с сефадексом и нашел, что скорость полимеризации мономерной кремневой кислоты меняется в зависимости от рН раствора. В сильнощелочном растворе мономерная кремневая кислота стабильна, но быстро полимеризуется в нейтральном растворе. В водном растворе при рН 2 полимеризация проходит медленнее, однако при еще меньших рН снова ускоряется. Гёррис [102] исследовал зависимость удельной поверхности и структуры адсорбента от температуры и рН исходного раствора и нашел, что с увеличением рН удельная поверхность уменьшается и одновременно увеличиваются средний радиус и объем пор ксерогеля. Эль Раиси и сотр. [102а] изучали влияние влажности и режима термообработки на активность силикагеля.

Хинц и сотр. [103] описали приготовление лепидоидной кремневой кислоты путем замораживания зольей кремневой кислоты или водных растворов силиката натрия, подвергнутых диализу. Этот гель характеризуется широким распределением частиц по размерам, и свойства его можно менять в широких пределах, варьируя рН исходных растворов, длительность старения и температуру осаждения. Полученный гель отличается очень высокой чистотой; он содержит столь малые количества железа, алюминия, кальция и магния, что эти примеси можно обнаружить только спектральным анализом. Авторы [103] указывают возможные области применения этого препарата и рекомендуют его, в частности, как адсорбент для ТСХ.

Ададек и сотр. [104] перед получением силикагеля очищали силикат натрия, пропуская его через ионообменник по методике Питры [105]. Для этого ионообменную смолу вольфатит KPS-200 переводили в Н⁺-форму, обрабатывая ее 4 %-ным раствором соляной кислоты. Готовили раствор силиката натрия плотностью 1,070 и добавляли концентрированный раствор гидроксида аммония из расчета 20 мл на 1 л раствора. При пропускании полученной смеси через колонку с катионами образовывался золь кремневой кислоты. Его желатинизировали, добавляя при энергичном перемешивании 25 % (по объему) 10 %-ного раствора карбоната аммония, оставляли на 24 ч, высушивали гель при 120°C, измельчали его и рассеивали по фракциям.

Рейхельт и Питра [106] описали метод изменения адсорбционных характеристик силикагеля для хроматографии на незакрепленном слое путем частичной дезактивации силикагеля. С этой целью к адсорбенту добавляют 25 % воды или 43 % разбавленной уксусной кислоты и оставляют стоять на 2 ч в закрытом сосуде, который время от времени встряхивают, чтобы обеспечить равномерное распределение влаги. Клейн [107] рекомендует для получения более воспроизводимых результатов проводить дезактивацию силикагелей в атмосфере с контролируемой влажностью. В табл. 3.1 (Стокс и Робинсон [108]) приведены растворы, позволяющие получить заданные значения давления водяных паров, а в табл. 3.2 указано давление паров воды над насыщенными растворами.

Специальные гели

В 1949 г. Дики [109] впервые получил модифицированные силикагели путем осаждения их в присутствии красителей — метилового, этилового, пропилового и бутилового оранжевого. Приготавливали гели следующим образом: 30 мл водного раствора силиката натрия ($d_{20}=1,401$) смешивали с 275 мл воды и 30 мл ледяной уксусной кислоты и добавляли 0,5 г тонкого порошка

Таблица 3.1

Растворы, позволяющие получить определенные давления паров воды при 25°C [108] ^{а, б}

a_w	H ₂ SO ₄		NaOH		CaCl ₂	
	<i>m</i>	%	<i>m</i>	%	<i>m</i>	%
0,95	1,263	11,02	1,465	5,54	0,927	9,33
0,90	2,224	17,91	2,726	9,83	1,584	14,95
0,85	3,025	22,88	3,840	13,32	2,118	19,03
0,80	3,730	26,79	4,798	16,10	2,579	22,25
0,75	4,398	30,14	5,710	18,60	2,995	24,95
0,70	5,042	33,09	6,565	20,80	3,400	27,40
0,65	5,686	35,80	7,384	22,80	3,796	29,64
0,60	6,341	38,35	8,183	24,66	4,188	31,73
0,55	7,013	40,75	8,974	26,42	4,581	33,71
0,50	7,722	43,10	9,792	28,15	4,990	35,64
0,45	8,482	45,41	10,64	29,86	5,431	37,61
0,40	9,304	47,71	11,54	31,58	5,912	39,62
0,35	10,21	50,04	12,53	33,38	6,478	41,83
0,30	11,25	52,45	13,63	35,29	7,183	44,36
0,25	12,47	55,01	14,96	37,45	—	—
0,20	13,94	57,76	14,67	40,00	—	—
0,15	15,81	60,80	19,10	43,32	—	—
0,10	18,48	64,45	23,05	47,97	—	—
0,05	23,17	69,44	—	—	—	—

^а С разрешения авторов и Am. Chem. Soc.

^б a_w (активность воды) = p/p_0 , где p — давление паров воды над раствором, p_0 — давление паров над чистой водой; m (моляльность) — число молей безводного растворенного вещества в 1000 г воды, % — процентное (по массе) содержание растворенного вещества.

красителя. Полученную смесь высушивали при комнатной температуре, измельчали, отсеивали нужную фракцию и промывали ее метанолом, чтобы удалить краситель.

Максимальная адсорбционная способность силикагеля, приготовленного в присутствии красителя, по отношению к этому красителю была в 4—20 раз выше, чем у обычных гелей. Адсорбционная способность по отношению к другим красителям была тем меньше, чем больше молекулы последних отличались от мо-

Таблица 3,2

Давление паров насыщенных растворов при 25°C [108] ^а

Твердая фаза ^б	a_w	Твердая фаза ^б	a_w
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,9800	NaBr·2H ₂ O	0,577
KNO ₃	0,9248	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,5286
BaCl ₂ ·2H ₂ O	0,9019	LiNO ₃ ·2H ₂ O	0,4706
KCl	0,8426	K ₂ CO ₃ ·2H ₂ O	0,4276
KBr	0,8071	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,3300
NaCl	0,7528	K(C ₂ H ₃ O ₂)·1,5H ₂ O	0,2245
NaNO ₃	0,7379	LiCl·H ₂ O	0,1105
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,7083	NaOH·H ₂ O	0,0703

^а С разрешения авторов и Am. Chem. Soc.

^б Формула соответствует твердой фазе, стабильной при контакте с насыщенным раствором при 25°C. Обозначения те же, что и в табл. 3.1.

лекула красителя, использованного при приготовлении геля. Эрленмейер и Бартельс [110] в 1964 г. применили тот же принцип для получения специфичных гелей для тонкослойной хроматографии. Эти авторы осаждали гели в присутствии метилфениламина и этилфениламина. Полученные гели проявляли аналогичную селективную адсорбцию. Майерс и Роджерс [111, 112] и Рид и Роджерс [113] изучали зависимость свойств специфичных гелей от условий осаждения и влияние изменений структуры модифицирующего агента на адсорбционные характеристики гелей. Бартельс [114] исследовал структуру специфичных гелей, осажденных в присутствии 1,10-фенантролина. Бартельс и Прийс [114а] посвятили специфичным гелям специальный обзор.

В 1961 г. Димов [115] показал, что адсорбционные свойства силикагеля меняются, если его обработать ионами серебра. Время удерживания увеличивается для этилена на 100 %, для пропилена на 50 %, а для этана и бутана остается прежним. Наблюдаемое изменение времени удерживания объясняется хорошо известной способностью нитрата серебра образовывать комплексы с ненасыщенными соединениями. Гёринг и сотр. [116] в 1961 г. и де Фриз [117] в 1962 г. использовали пропитанный нитратом серебра силикагель для колоночной хроматографии, а Моррис [118] и Баррет и сотр. [23] применили аналогичный адсорбент в тонкослойной хроматографии липидов. Обычно нитрат серебра добавляют либо в суспензию при приготовлении

пластинок, либо наносят на уже готовые пластинки. Приготовление таких пластинок рассмотрено в соответствующих главах. Гупта и Дев [119] описали приготовление сухого порошка силикагеля, пропитанного нитратом серебра. Нитрат серебра (7,5 г) растворяют в 7,5 мл воды и добавляют 125 мл спирта. В полученном растворе диспергируют 50 г силикагеля, добавляя его небольшими порциями, и перемешивают смесь 15 мин. Избыток растворителя отгоняют на водяной бане при непрерывном перемешивании и порошок высушивают в вакууме до постоянной массы. При хранении в темноте полученный адсорбент остается пригодным к употреблению в течение нескольких месяцев.

Меркл и Хехт [120] приготовили силикагель, пропитанный триэтиламином, образующим комплексы с ионами металлов. 16,8 г силикагеля обрабатывали раствором, содержащим 2 мл амина в 25 мл эфира. Чтобы удалить эфир, смесь выдерживали 2 ч в сушильном шкафу при 100°C. Туерлер и Хегл [120а] использовали двузамещенную натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты для удерживания мешающих ионов металлов. Для этого они наносили адсорбент на пластинку в виде суспензии, содержащей на 50—60 мл воды 30 г силикагеля G и 0,1—0,2 г комплексобразователя.

Видрайн и Николас [121] описали метод силикации силикагеля. Силикагель диспергируют в безводном толуоле и при постоянном перемешивании несколько раз добавляют по 1 мл диметилдихлорсилана. Перемешивание продолжают до тех пор, пока не перестанут выделяться пузырьки хлористого водорода. Смесь оставляют на ночь, после чего отфильтровывают силикагель, промывают его тремя объемами безводного бензола и тремя объемами безводного метанола, сушат 4 ч в вакууме и затем в течение нескольких часов при 70°C. 43 % полученного продукта смешивают с 50 % необработанного силикагеля и с 7 % гипса, выполняющего роль связующего. Слой полученного адсорбента можно использовать в одном направлении для адсорбционной хроматографии, а в другом — для распределительной хроматографии с обращенной фазой.

В работе [122] приведена методика получения триметилсилилированного силикагеля. Смесь 160 мл циклогексана, 50 г силикагеля и 34 мл гексаметилдисилазана кипятят с обратным холодильником в течение часа, после чего добавляют 2 мл изопропанола и кипятят еще 3 ч. Далее адсорбент отфильтровывают, промывают изопропанолом, высушивают при 130°C в течение трех дней и хранят в эксикаторе. Полученный гель гидрофобен, поэтому его наносят на пластинки в виде суспензии в смеси метанол—вода (1:1).

Гилпин и Сиско в работе [122а] сравнивают адсорбционные характеристики силикагелей, обработанных метил-, этил-, гексил-, додецил- и октадецилтрихлорсиланами.

В некоторых случаях необходим особенно чистый силикагель. Так, при тонкослойной хроматографии неорганических соединений адсорбент должен быть свободен даже от следовых примесей катионов. При разделении органических веществ иногда также нужно избегать присутствия даже следов ионов металлов, которые могут сыграть роль катализаторов. Сейлер и Ротвейлер [123] предложили следующую методику очистки силикагеля. 500 г силикагеля диспергируют в 1 л смеси воды и концентрированной соляной кислоты (1:1) и оставляют на некоторое время, после чего желтый раствор, содержащий железо, сливают. Промывку повторяют еще дважды. Затем трижды промывают силикагель декантацией дистиллированной водой порциями по 1 л, фильтруют и промывают на фильтре дистиллированной водой до нейтральной или слабокислой реакции фильтра. После этого промывают адсорбент последовательно 250 мл этанола и 250 мл бензола и сушат 24 ч при 120°C. Липина [124] обрабатывала силикагель концентрированной соляной и концентрированной азотной кислотами. Пассера и сотр. [125] промывали силикагель соляной кислотой (1:1), водой и в заключение 0,1 %-ным (масса/объем) водным раствором ЭДТА для удаления мешающих ионов.

Иногда нужно удалить органические вещества, адсорбированные на силикагеле. Как показали Кирхнер и сотр., это можно сделать после нанесения слоя адсорбента [126] путем элюирования пластинки подходящим растворителем с последующим высушиванием. Однако промыть растворителем адсорбент можно и до нанесения его на пластинку [127]. Страк [128] выдерживал силикагель в метаноле в течение ночи, отфильтровывал его, промывал еще дважды метанолом и высушивал при 100°C в течение получаса. Боур и сотр. [129] промывали кремневую кислоту смесью хлороформа с метанолом (2:1). Приветт и Бланк [130] с этой же целью обрабатывали кремневую кислоту сначала хлороформом, а затем эфиром. Миллер и Кирхнер [127] показали, что в некоторых случаях приходится соблюдать особые предосторожности, чтобы не загрязнить промытый адсорбент в процессе сушки примесями из окружающего воздуха. Эти авторы использовали для сушки адсорбента модифицированный стандартный сушильный шкаф с принудительной вентиляцией и со специальным уплотнением вокруг оси вентилятора. Воздух для осушки пропускали через фильтр с кремневой кислотой. Саммерс и Мефферд [131] для работы с липидами чистили силикагель в аппарате Сокслета, последовательно экстрагируя его гептаном, хлороформом и 95 %-ным этанолом. Каждая

экстракция длилась примерно 12 ч. Керро и сотр. [132] обрабатывали 100 г силикагеля 400 мл 0,2 %-ного раствора этилата натрия в течение 30 минут при 60—70°C, после чего отделяли адсорбент центрифугированием и в тех же условиях обрабатывали 200 мл 20 %-ного раствора уксусной кислоты в этаноле. Полученный продукт отфильтровывали и еще несколько раз промывали этанолом. Ма [133] показал, что примеси могут адсорбироваться силикагелем при хранении его в пластиковых сосудах или мешках, а также в стеклянных сосудах, закупоренных резиновыми пробками. Он рекомендует хранить очищенный силикагель в стеклянных бутылках с завинчивающимися колпачками, снабженными тефлоновыми прокладками.

Оксид алюминия

Во всех вариантах хроматографии чаще всего используется поставляемый различными фирмами готовый оксид алюминия. Однако этот адсорбент можно получать и самим. Так, согласно Рейхстейну и Шоппи [134], его получают, нагревая гидроксид алюминия в течение примерно 3 ч при 380—400°C при постоянном перемешивании. Такой оксид алюминия всегда содержит свободную щелочь. Вислиценус [135] рассматривает свойства и хроматографическое применение волокнистого оксида алюминия, полученного гидролизом амальгамированного оксида алюминия. В работе Ханека [136] дана методика приготовления аналогичного продукта, предназначенного для ТСХ. По сути дела это несколько модифицированная методика Вислиценуса. 50 г алюминиевых опилок (размер частиц ~0,5 мм) обрабатывают 100 мл 10 %-ного раствора гидроксида натрия до прекращения бурного выделения водорода. Щелочь удаляют декантацией. Обработку повторяют еще раз, после чего отмывают алюминий от щелочи, приливают к нему 10 мл насыщенного раствора хлорида ртути и перемешивают смесь. Серый шлам удаляют декантацией и частицы промывают водой. Реакция проходит бурно и сопровождается выделением паров. Чтобы получить порошок оксида алюминия, к смеси при перемешивании добавляют 80—100 мл воды. Далее порошок промывают этиловым спиртом, отделяют декантацией от непрореагировавшего металлического алюминия, отфильтровывают, высушивают, прокалывают и просеивают через сито с размером отверстий 0,066 мм. Полученный адсорбент используют без связующего.

Байтшольц и Эрдель [136a] наносили тонкие слои нейтрального оксида алюминия на готовые хроматографические пластинки, погружая их в смесь, содержащую 5 мл 10 %-ной уксусной кислоты и 345 мл этанола. Кислые тонкослойные пластинки эти авторы получали, погружая готовые пластинки в специаль-

ную смесь, которую готовили следующим образом. 23,6 г ацетата натрия растворяли в 70 мл воды, добавляли 10,5 мл уксусной кислоты и доводили объем смеси этанолом до 350 мл. pH полученных в результате пластинок был равен 5—6.

Халпаап и Рейх [137] исследовали структуру и адсорбционные характеристики оксидов алюминия, полученных путем нагревания гидраргиллита при различных температурах вплоть до 1150°C.

Оксиапатит

Для отделения одного или двух моноглицеридов от белков Хофман [138, 139] использовал оксиапатит, который представляет собой частично гидролизированный фосфат кальция, получаемый щелочным гидролизом однозамещенного основного фосфата кальция. Это более слабый адсорбент, чем кремневая кислота, и на нем можно проводить разделение неионизованных или нейтральных соединений. Эйнакер и Стой [140] готовили оксиапатит следующим образом. 250 г гидратированного двухосновного фосфата кальция диспергируют в 2,5 л 0,05 М раствора гидроксида натрия при 40°C. Когда pH уменьшается до 8—9, жидкость сливают, вновь добавляют свежий 0,05 М раствор гидроксида натрия, нагретый до 40°C, и оставляют смесь на 24 ч. Описанную процедуру повторяют три-четыре раза до тех пор, пока pH не перестанет заметно меняться. Затем осадок отфильтровывают и промывают 0,005 М раствором NaH_2PO_4 до тех пор, пока pH промывной воды не станет равным 6—7. После этого осадок промывают спиртом, затем ацетоном и высушивают. Сухой продукт просеивают через сито 170 меш. Более грубые частицы можно измельчить на шаровой мельнице и просеять повторно. Эйнакер и Стой [140] сами приготавливали двухосновный фосфат кальция из одноосновного фосфата.

Силикат магния

Уолфром и сотр. [141] нашли, что pH водной суспензии магнезола (синтетический силикат магния, выпускаемый фирмой Waverly Chemical Co., равен 9,8 и что по своим хроматографическим характеристикам этот магнезол отличается от ранее выпускавшегося предприятием Westvaco Cloralkali Division фирмы Food, Machinery and Chemical Corp. Поэтому эти авторы подвергали магнезол следующей обработке. 500 г магнезола фирмы Waverly диспергируют при перемешивании в течение часа в растворе 100 мл ледяной уксусной кислоты в 2 л воды. Порошок отфильтровывают, диспергируют в 2 л воды и перемешивают

в течение примерно 12 ч, затем вновь отфильтровывают и промывают 1 л воды. Полученный продукт, имеющий рН 7,5, сушат 10 ч при 100°C. Для ТСХ используют фракцию с частицами размером меньше 200 меш. Шварц [142] обрабатывал уксусной кислотой флорисил (флоридин), чтобы уменьшить рН до 6,5, поскольку обычно этот продукт имеет рН 8,5.

Силикат магния состава $Mg_3[Si_4O_{10}](OH)_2$, известный под названием талька, использовался рядом авторов для разделения антибиотиков [143], алкалоидов [144], порфиринов [145, 146] и сердечных гликозидов [147].

Оксид магния

Бомхоф [148] показал, что свойства оксида магния зависят от метода его приготовления. Оксид магния с максимальной удельной поверхностью (190 м²/г) получают, нагревая гидроксид магния при 400°C в течение 12 ч. Адсорбент наносят на пластинки в виде суспензии, содержащей 7 г оксида магния и 7 г кизельгура G в 70 мл хлороформа. Пластинки сушат на воздухе и активируют при 120°C. Тьюери и Рем [149] наносили на пластинки водную суспензию, содержащую оксид магния и крахмал в соотношении 4 : 1.

Сульфат кальция

Мейтис и сотр. [150] получали сульфат кальция, смешивая эквимольные количества серной кислоты и водного раствора хлорида кальция. Реакцию проводили при перемешивании при температуре 70—80°C. Осажденный сульфат кальция отфильтровывали и промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Затем полученный продукт измельчали и сушили 40 ч при 115—120°C.

Для приготовления тонкослойных пластинок использовали алебастр ($CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$) [151, 152]. Митчел [153] получал алебастр, нагревая $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (осажденный сульфат кальция фирмы Fisher Certified Reagents) в течение примерно 12 ч при 175°C. Добичи и Грассини [154] использовали полоски со слоем алебаstra для разделения веществ методом электрофореза.

Целлюлоза

Хаммершмидт и Мюллер [155] описали метод обработки целлюлозного порошка с целью удаления мешающих катионов. Для этого целлюлозный порошок обрабатывают при перемешивании

1,5%-ной азотной кислотой при 50°C в течение 2 ч, после чего тщательно промывают дистиллированной водой.

Уолфром и сотр. [156] диспергировали 50 г технической микрокристаллической целлюлозы (фирма Avicel) в 1 л 0,1 н. раствора борогидрида натрия и выдерживали при перемешивании в течение 10 ч. После осаждения твердой фазы жидкость сливали и процесс повторяли со свежим раствором борогидрида. Порошок отфильтровывали, промывали до нейтральной реакции и высушивали в вакууме над пятиокисью фосфора. Полученный осадок измельчали в ступке.

Патаки [157] проводил хроматографическое разделение нуклеотидов на целлюлозе, очищенной следующим образом. 60 г порошка целлюлозы диспергируют в смеси *n*-пропанола, 25 %-ного раствора аммиака и воды (6 : 3 : 1). Суспензию энергично встряхивают в течение 30 мин, отфильтровывают твердую фазу, промывают *n*-пропанолом и высушивают в вакууме при 60°C.

Хоуворс и Хискоут [157а] привели метод очистки целлюлозы, предназначенной для разделения аминокислот. 50 г целлюлозы диспергируют в 200 мл 80 %-ного метанола, отфильтровывают и промывают последовательно 300 мл смеси пропанола-2, уксусной кислоты и воды (3 : 1 : 1), 200 мл смеси метанола и воды (1 : 3), 200 мл смеси метанола и 1 н. соляной кислоты (3 : 2), 200 мл воды и 200 мл метанола. Полученный продукт сушат примерно 12 ч в вакууме.

Ацетилцеллюлоза

В работе Виланда и сотр. [158] описан следующий метод получения ацетилированной целлюлозы. 30 г порошка целлюлозы сушат 15—30 мин при 110°C, а затем в течение нескольких часов в эксикаторе над концентрированной серной кислотой. Сухой порошок диспергируют и выдерживают 9 ч в смеси 225 мл уксусного ангидрида, 675 мл бензола и 0,9 мл концентрированной серной кислоты. Твердую фазу отфильтровывают, промывают метанолом и оставляют в метаноле на несколько часов, после чего опять отфильтровывают, промывают эфиром и высушивают в вакуумном сушильном шкафу при 90°C. Беджер и сотр. [159] ацетилировали целлюлозу по методу Спотсвуда [160]. 200 г порошка целлюлозы диспергируют в смеси, содержащей 1700 мл бензола, свободного от тиофена, 800 мл перегнанного уксусного ангидрида, 4 г 92 %-ной серной кислоты и 4 г 72 %-ной хлорной кислоты, и интенсивно перемешивают в течение 24 ч при 18°C. Ацетилированную целлюлозу отфильтровывают, заливают этиловым спиртом и оставляют на 24 ч, время от времени перемешивая. По окончании выдержки продукт

тщательно промывают спиртом и водой, оставляют в дистиллированной воде на 2 ч и, наконец, отфильтровывают и высушивают на воздухе.

Кератин

Бреди и Хоскинс [161] разработали метод получения кератина для ТСХ. 60 г продажной очищенной шерсти кипятят 3 ч в растворе, содержащем 20 г бисульфита натрия и 20 г папаина в 2 л воды. рН раствора доводят до 6,5, добавляя 1 н. раствор гидроксида натрия. Коровые клетки отфильтровывают, трижды промывают дистиллированной водой порциями по 500 мл и вновь диспергируют в 300 мл воды. рН суспензии доводят до 3,0, добавляя 6 н. раствор соляной кислоты. Смесь нагревают 30 мин при 75°C, твердую фазу отфильтровывают, промывают и хранят в дистиллированной воде с небольшой добавкой хлороформа, чтобы предотвратить рост микроорганизмов. Для нанесения на пластинки 14 г клеток диспергируют в 100 мл смеси этанола с водой (1:1). В работе [161] описаны также методы модифицирования этого адсорбента путем его метилирования или дезаминирования.

Прочие адсорбенты

Большинство работ по ТСХ выполнено на обычных адсорбентах. Однако некоторые адсорбенты используются лишь эпизодически или вообще в считанных случаях. В работе Экермена и Фрея [162] сравнивается пригодность для ТСХ порошков кварца и силикагеля. В работе [163] описано разделение 11 ионов металлов на фториде магния. Сульфид цинка был использован в качестве адсорбента для разделения геометрических изомеров [164], а гипофосфат циркония — для разделения неорганических ионов [165]. Соль Мадреля оказалась хорошим адсорбентом для разделения семи сахаров, девяти аминокислот и низкомолекулярных дикарбоновых кислот [166]. На ферроцианиде цинка было достигнуто хорошее разделение ионов натрия, калия, рубидия и цезия [167], а также некоторых сульфонамидов [168]. Сульфат бария использовали для разделения пищевых красителей [169] и красок, предназначенных для покрытия металлов [170]. В качестве ионообменников для разделения неорганических ионов испытывались кристаллические фосфаты титана и циркония [171], фосфат церия [172, 173] и арсенат циркония [174]. Для разделения радиоизотопов ^{90}Sr и ^{90}Y была использована смесь сульфата стронция и кремневой кислоты [175]. Оксид титана был испытан в качестве адсорбента для разделения *o*-, *m*- и *p*-аминофенолов [176].

3. СВЯЗУЮЩИЕ МАТЕРИАЛЫ

Крахмал

В литературе много раз обсуждался вопрос о целесообразности применения тонких порошков адсорбентов без связующего, однако до сих пор наиболее популярным адсорбентом является силикагель G, в котором в качестве связующего используется алебастр, впервые введенный в употребление Кирхнером и сотр. [2]. Автор настоящей книги предпочитает вводить в адсорбенты в качестве связующего крахмал, если, конечно, он не мешает обнаружению компонентов. Это ограничение не столь серьезно, как может показаться. Так, Кирхнер и сотр. [2] нашли, что для обнаружения компонентов на пластинках, содержащих крахмал в качестве связующего, пригодна даже смесь концентрированных серной и азотной кислот, если только не нагревать пластинки. Смит и Фолль [177] указывают, что в числе прочих реактивов для обнаружения разделенных компонентов на пластинках в крахмалом в качестве связующего пригодны треххлористая сурьма, фосфорная кислота и трихлоруксусная кислота. При применении одного и того же растворителя разделение на слое с крахмалом в качестве связующего происходит быстрее, чем на слое с гипсом, и можно получить гораздо более твердую поверхность. При этом скорость разделения не снижается. Благодаря большой твердости поверхности можно быстро провести разметку пластинки мягким свинцовым карандашом, не портя ее. Кроме того, в некоторых ситуациях гипс просто неприменим. Так, например, Зейлер [178] нашел, что при разделении фосфатов гипс реагирует с разделяемыми компонентами с образованием нерастворимого фосфата кальция, поэтому в качестве связующего он выбрал крахмал.

Кирхнер и Фленеган [179, 180] определяли влияние связующего на скорость хроматографирования (табл. 3.3). Как показывают приведенные в таблице данные, разделение на пластинках с крахмалом в качестве связующего происходит быстрее во всех рассмотренных случаях. Даже кремневая кислота с добавкой 20 % гипса не позволяет получить такой прочный слой, как адсорбент с добавкой крахмала. Силикагель G с меньшим содержанием гипса дает довольно хрупкий слой, писать на котором трудно, если вообще возможно. Однако не следует забывать, что связующим может быть не любой крахмал: некоторые сорта крахмала при высушивании трескаются. Миллер и Кирхнер [181] исследовали ряд сортов крахмала и нашли, что к числу хороших связующих можно отнести крахмалы сорта «Клинко-15» (модифицированный крахмал фирмы Clinton Corn

Таблица 33

Влияние связующего на скорость хроматографирования (время в минутах, за которое растворитель проходит расстояние в 10 см) [180]

Адсорбент	Растворитель				
	гексан	бензол	этил-ацетат	95%-ный этанол	вода
Кремневая кислота + 2,5 % крахмала	14	19	15	72	20
Силикагель	32	39	43	97	49
Кремневая кислота + 2 % гипса	46	75	60	223	72

Processing Co.) и смесь обычного пшеничного крахмала с тапиоковой мукой марки супер АА (фирма Stein-Hall Co.) в отношении 2:1. Кроме перечисленных сортов крахмала в качестве связующего компонента применялись такие сорта крахмала, как амиока, рисовый, кукурузный, картофельный и пшеничный. Кирхнер и Фленеган [179] установили, что если уменьшить количество крахмала с 5 до 2 %, строго соблюдать температуру и время при изготовлении адсорбента не обязательно, достаточно хорошо прогреть смесь на водяной бане.

Другое преимущество крахмала как связующего состоит в том, что суспензию можно хранить в холодильнике в течение нескольких месяцев. В лаборатории автора суспензии сохранялись в течение двух месяцев при комнатной температуре и рассеянном свете. Благодаря этому можно сразу готовить большие количества суспензии и хранить ее в готовом для употребления виде.

Гипс (алебастр)

В тех случаях, когда применяемые обнаруживающие реактивы реагируют с крахмалом, Кирхнер и сотр. [2] предлагают в качестве связующего гипс. Главный недостаток, связанный с применением этого связующего, — увеличение длительности элюирования хроматограммы и уменьшение прочности слоя. Поскольку алебастр затвердевает довольно быстро, готовить большие количества материала впрок нельзя.

Для большинства работ по ТСХ пригоден алебастр обычного качества, выпускаемый многими фирмами. Однако Беттейл и сотр. [87] и Пейфер [4] считают целесообразным получать алебастр собственноручно. С этой целью они нагревали химически

чистый $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (гипс) в одном случае при 110°C в течение ночи, а в другом — при 180°C в течение 24—48 ч. Полученный прокаленный гипс (алебастр) можно измельчить, чтобы получить фракцию, проходящую через сито в 200 меш. Алебастр, выполняющий роль связующего, добавляют к адсорбенту в количестве 5—20 %. При 5 %-ной добавке слой очень мягкий, при 20 %-ной — более твердый (однако все же мягче, чем слой с крахмальным связующим). Чем больше содержание алебастра в адсорбенте, тем медленнее идет разделение.

Слой адсорбента с гипсом в качестве связующего вообще отличаются мягкостью. Хотя гипс, регенерированный из алебаstra, теряет кристаллизационную воду при 100°C и образует растворимый ангидрид, процесс этот происходит медленно. Слой на пластинках, высушенных в течение 24 ч при 80°C , не мягче, чем на пластинках, высушенных в течение 30 мин при 110°C . Если сушить пластинки 2 ч при 110°C , гипс теряет свои связующие свойства. При 130°C гипс теряет связующие свойства уже через 45 мин.

Карбоксиметилцеллюлоза

Это связующее, по-видимому, весьма перспективное, впервые ввели в практику Обрейтер и Стоув [182] в 1964 г. Эти авторы добавляли к адсорбенту (кремневой кислоте) 5 % высокосортной маловязкой карбоксиметилцеллюлозы № 70 фирмы Hercules Powder Co. Автор данной книги обнаружил, что полученные таким способом слои более склонны к растрескиванию, чем слои с крахмалом в качестве связующего. Однако уменьшение концентрации связующего до 2,5 % улучшает свойства слоя в этом отношении. Можно приготовить удовлетворительные слои адсорбента толщиной до 2 мм. Толщина слоя должна быть одинаковой, так как даже при малейших неоднородностях по толщине слоя происходит растрескивание. Поверхность полученных слоев достаточно твердая, и на ней легко можно писать свинцовым карандашом.

Прочие связующие

Оно [183] использовал в качестве связующего поливиниловый спирт. Чтобы приготовить такой адсорбент, он диспергировал 23 г силикагеля в 30 мл 2,5 %-ного раствора поливинилового спирта. При приготовлении этой суспензии в смесь необходимо добавить несколько капель спирта, чтобы предотвратить вспенивание. Рендерас [184] опробовал коллодий в качестве связующего для целлюлозы марки ECTEOA, а Хуттенрах и сотр. [185] применили коллодий в качестве связующего для ионообменных смол. Хофман [138, 139] добавлял к оксиапатиту

в качестве связующего цителъ 61 (растворимый в спирте полиамид фирмы Du Pont). 40 мг цителя растворяли в 60 мл 70 %-ного (по объему) метанола в закрытом сосуде при нагревании и перемешивании. После охлаждения диспергировали в смеси 15 г оксиапатита. Были испытаны адсорбенты, содержащие 0,5, 1 и 4 % этого связующего [138]. В качестве связующих разные авторы использовали также полиэтилен [186], эпоксидную смолу [187], полиакриламид [188] и поливинилацетат [189]. Авторы работы [190] для этой цели применяли силикат натрия. Они готовили суспензию, содержащую 40 г диоксида кремния в 115 г 6 %-ного раствора силиката натрия фирмы Ваите и наносили ее на стеклянные пластинки. Олсаус и Нойхоф [191] погружали стеклянные пластинки в суспензию 30 г силикагеля в 130 мл смеси хлороформа с метанолом (2:1), высушивали и пропитывали пластинки раствором растворимого стекла в воде (1:20), используя обычное элюирование. Биркофер и сотр. [192] вводили в смесь силикагеля с порошком перлона в качестве связующего желатину, а Готье и Манженс [193] использовали арабийскую камедь для связывания кизельгура, пропитанного формамидом. Майни [194] предложил добавлять агар-агар в качестве связующего к силикагелю и оксиду алюминия. Это увеличивает стабильность слоя и адгезию агаровых дисков, применяемых для нанесения проб. Еллинек [195] подтвердил пригодность агар-агара в качестве связующего и показал, что на адсорбентах с этим связующим хроматографирование идет быстрее, чем на адсорбентах с гипсом. Кроме того, слои, содержащие агар-агар, реже соскальзывают с пластинок при погружении в растворитель, чем слои с гипсовым связующим. Окумура и сотр. [196—198] предложили для силикагеля и оксида алюминия в качестве связующего порошок плавного стекла. Полученные слои были механически прочными, термостойкими и кислотоупорными. Такие пластинки можно использовать многократно. Для регенерации их промывали в подходящем растворе и вновь активировали.

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУСПЕНЗИИ

До настоящего времени большая часть работ по ТСХ проводится на слоях, приготовленных из водных суспензий адсорбентов. Даже при одной и той же концентрации и типе связующего количество воды, необходимое для приготовления данной суспензии, зависит от марки адсорбента. Если суспензию наносят на пластинку вручную с помощью пульверизатора, концентрация суспензии не имеет большого значения. Однако если нанесение тонких слоев проводится с помощью специального прибора, то концентрацию суспензии необходимо тщательно кон-

тролировать. Если суспензия слишком густая, пульверизатор засорится, а если слишком жидкая, то скорость распыления будет чересчур велика.

Водные суспензии силикагеля с алебастром в качестве связующего

Фирмы—поставщики готовых адсорбентов, специально предназначенных для ТСХ, рекомендуют при приготовлении суспензий силикагеля придерживаться определенных пропорций.

Для приготовления слоев толщиной 2—5 мм для препаративного разделения Хонегер [199] использовал суспензию силикагеля G в воде в отношении 1:1,57.

Чтобы смешать адсорбент с водой, смесь помещают в колбу или же смешивание проводят в ступке. Свеннерхольм и Свеннерхольм [200] для этой цели в течение минуты энергично встряхивали суспензию в сосуде, присоединенном к водоструйному насосу, чтобы удалить воздух из смеси.

Для хроматографии веществ, поглощающих в УФ-свете, целесообразно добавить флуоресцирующий в УФ-свете индикатор в суспензию в процессе ее приготовления. В этом случае разделенные вещества при облучении пластинки видны в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне. Флуоресцирующие пластинки первыми ввели в практику Кирхнер и сотр. в 1951 г. [2], хотя Шталь [201] считает, что первым это сделал Гаеншерт.

В качестве флуоресцирующих добавок можно применять неорганические флуоресцирующие соединения, которые Сизе использовал в колоночной хроматографии [202, 203]. Наилучшие результаты получаются, если добавлять к смеси адсорбента со связующим 1,8 % сульфида цинка-кадмия (фосфор № 1502 фирмы Du Pont) и 1,8 % силиката цинка (фосфор № 609 фирмы Du Pont). По данным Сизе [203], силикат и сульфид цинка дают смесь, флуоресцирующую при возбуждении излучением с длиной волны 390—230 нм. Облучать слои, содержащие эти соединения, можно водородной лампой, причем обычно удобнее применять две лампы—одну с более коротковолновым, а другую с длинноволновым ультрафиолетовым излучением. Рейтсема [95] добавлял в качестве флуоресцирующего компонента родамин 6G в количестве 0,0011 г (0,0037 %) на 30 г смеси адсорбента со связующим. В работе Шталя [204] флуоресцирующим реагентом служил флуоресцеин натрия. Суспензию адсорбента готовили не на воде, а на 0,04 %-ном водном растворе этого реактива Браун и Джонстон [205] готовили суспензии на 0,02 %-ном растворе 2', 7'-дихлорфлуоресцеина. Чеше и сотр. [206] применяли в качестве флуоресцирующих агентов 3,5-диоксипирен-8,10-дисульфат натрия или 3-оксипирен-5,8,10-три-

сульфонат натрия. В расчете на 1 г силикагеля в суспензию вводили 0,25 мг первого реагента или 0,33 мг второго. Однако оба эти реактива имеют один и тот же недостаток: смываются с адсорбента растворителями, более полярными, чем смесь метанол—хлороформ (7:3).

Водные суспензии силикагеля с крахмалом в качестве связующего

Пытаясь ослабить влияние температуры и длительности хранения пластинок на их свойства, Кирхнер и Фленеган [179] видоизменили первоначальную рецептуру Кирхнера и сотр. [2]. Согласно новому рецепту, готовят смесь, содержащую 19 г кремневой кислоты или силикагеля, 0,5 г крахмала (крахмал клинко-15 фирмы Clinton Corn Processing или смесь (2:1) обычного пшеничного крахмала и тапиоковой муки высшего качества фирмы Stain-Hall Co.) и 38 мл дистиллированной воды. Если необходимо получить флуоресцирующий слой, можно добавить по 0,37 г сульфида цинка-кадмия и силиката цинка. Смесь нагревают при перемешивании на кипящей водяной бане до полной желатинизации крахмала. Если нужно получить более жидкую суспензию, то после завершения желатинизации можно добавить еще воды. Полученную суспензию можно хранить в обычном холодильнике в течение многих месяцев. При рассеянном свете ее можно хранить два месяца даже при комнатной температуре.

Водные суспензии модифицированных силикагелей

Кислый силикагель. Шталь [207] использовал идею Брокмена и Грёне [208], готовивших кислый силикагель для колонной хроматографии. Он получил тонкие слои кислого силикагеля, заменив при приготовлении суспензии дистиллированную воду на 0,5 н. раствор щавелевой кислоты. Детерс [209] для той же цели применил 0,05 н. раствор щавелевой кислоты. Сехер [210] показал, что если такие пластинки сушить при 105°C, то в процессе сушки теряется от 20 до 25 % щавелевой кислоты. Ронкайнен [211] получил кислый силикагель G из смеси 30 г силикагеля G, 60 мл воды и 5 мл пропионовой кислоты. Влияние такой обработки силикагеля на величину R_B показано в табл. 3.4. Петрович [212] сравнил влияние различных кислот в качестве подкисляющих добавок на величины R_f некоторых хлорсодержащих соединений (табл. 3.5).

Нейтральный силикагель. Смит и Фёлл [177] готовили нейтральный силикагель, смешивая 30 г тонкого порошка силикагеля фирмы Fisher (NS-158), 50 мл воды, содержащей 16 мл

Таблица 3 4

Влияние подкисления адсорбента (силикагеля G) на величины R_B^a некоторых динитрофенилгидразонов кетокислот [211] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co)

Толщина слоя, мм	Адсорбент	R_B^b							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0,10	Нейтральный	0,58	0,56	0,59	0,48	0,28	0,56	0,05	0,02
0,10	Кислый	0,48	0,48	0,39	0,29	0,20	0,49	0,02	0,02
0,16	Нейтральный	0,50	0,51	0,43	0,35	0,24	0,55	0,04	0,01
0,17	Кислый	0,45	0,42	0,37	0,30	0,20	0,52	0,02	0,00

^a $R_B = R_f(\text{ДНФ-кетокислоты})/R_f(\text{динитрофенилгидразина})$. Растворитель — смесь петролейного эфира (т. кип. 60—80°C) и этилформата (13:7) с добавкой 0,0104 моль пропионовой кислоты на 100 мл смеси растворителей.

^b 1 — α -кето- β -метилвалериановая кислота; 2 — α -кетоизокапроновая кислота; 3 — α -кетонвалериановая кислота; 4 — α -кетомасляная кислота; 5 — пировиноградная кислота; 6 — леулиновая кислота; 7 — α -кетоглутаровая кислота; 8 — щавелевоуксусная кислота.

0,1 н. раствора гидроксида натрия, и 1,5 г рисового крахмала фирмы Matheson, Coleman and Bell. Смесь осторожно нагревали на паровой бане до загустения, после чего разбавляли водой до надлежащей консистенции. При этом получался силикагель с рН 6,4.

Основной силикагель. Аналогичным методом Шталь [207] приготовил основной силикагель. Вместо воды при приготовлении суспензии он брал 0,5 н. раствор щелочи. Тейхерт и сотр. [213] готовили основной силикагель, смешивая 22 г силикагеля G с 45 мл 0,5 н. или 0,1 н. раствора гидроксида калия, в зависимости от желаемой щелочности слоя. Скипски и сотр. [214] для получения основного силикагеля использовали 0,01 н. растворы карбоната или ацетата натрия. Грёгер и сотр. [215] готовили основной силикагель с крахмальным связующим. Для этого они использовали кремневую кислоту № 1169 фирмы Baker and Adamson (Allied Chemical Corp.), просеянную сквозь сито 100 меш. 25 г такого силикагеля диспергировали в 80 мл 1 %-ного раствора гидроксида калия, добавляли раствор 1,3 г крахмала, полученного из кукурузы сорта «Арго» (фирмы Best Foods Division CPC, International), в 10 мл 1 %-ного гидроксида калия, смесь нагревали 15 мин при 70°C, затем добавляли еще некоторое количество 1 %-ного раствора гидроксида калия для разжижения смеси.

Изменение значений $R_f \times 100$ при подкислении силикагеля некоторыми кислотами [212]^a

Соединение	Раствор кислоты, использованный для приготовления слоя																	
	борная, 1 %			щавелевая, 1 %			винная, 1 %			лимонная, 1 %			салициловая, насыщен- ный раствор			фталевая, 0,5 %		
	б ^б	x ^б	z ^б	б	x	z	б	x	z	б	x	z	б	x	z	б	x	z
Пентахлорфенол	64	70	05	61	66	07	72	07	53	74	05	53	60	04	62	65	10	
ДДТ	96	97	50	94	96	45	96	48	96	96	46	96	97	46	92	95	48	
α-Гексахлорцикло- гексан	92	93	27	88	93	26	91	26	91	88	24	93	94	27	90	92	22	
β-Гексахлорцикло- гексан	92	93	04	88	93	03	91	06	91	88	04	93	94	04	90	92	04	
γ-Гексахлорцикло- гексан	92	93	18	88	93	14	91	17	91	88	15	93	94	17	90	92	15	
δ-Гексахлорцикло- гексан	92	87	11	88	88	10	91	11	91	88	10	93	83	10	90	92	10	

^a С разрешения автора и Alfred Huehning Verlag.
^б Элюэнты б — бензол, х — хлороформ, z — гексан

Забуференный силикагель

Борке и Кирх [216] в 1953 г. первыми применили в ТСХ забуференный адсорбент. Приготавливали они его следующим образом. Смесь кремневой кислоты с оксидом магния (по 10 г каждого) смешивали с 4 г алебастра и 0,250 г силиката цинка и 0,250 г сульфида цинка-кадмия. Последние два реагента выполняли роль флуоресцирующей добавки. Порошки тщательно перемешивали в ступке, после чего добавляли 38 мл фосфатного буфера (рН 6,6) и растирали 2 мин до получения кремоподобной суспензии, которую наносили на стеклянные полоски. При использовании флуоресцирующих добавок буферные смеси с рН ниже 6,6 непригодны, поскольку при большей кислотности флуоресцентные свойства этих добавок исчезают. Хонегер [217] готовил пластинки с адсорбентом, забуференным цитратом. Он смешивал 25 г силикагеля G с 50 мг 0,1 М буферного раствора на основе цитрата натрия (рН 3,8). Из приведенных примеров видно, что любой требуемый буфер можно ввести в адсорбент, заменив воду в суспензии на соответствующий буферный раствор.

Силикагель, пропитанный комплексообразователями

Мейнхард и Холл [1] первыми предложили применять в ТСХ комплексообразователи, однако цель, которую они перед собой ставили, состояла не в том, чтобы улучшить разделение, а в том, чтобы облегчить таким образом обнаружение пятен компонентов. Эти авторы вводили в некоторые адсорбенты 8-оксихинолин, но получить достаточно воспроизводимых результатов им не удалось. В 1961 г. Димов [115] применил принцип модифицирования поверхности силикагеля ионами серебра в газовой хроматографии. В том же году Гёринг и сотр. [116] провели разделение методом колоночной хроматографии на силикагеле, обработанном раствором нитрата серебра, а Моррис [118] и Баррет [23] в 1962 г. применили тот же адсорбент в ТСХ. Очень важная особенность этого адсорбента состоит в том, что он селективен к олефинам благодаря образованию комплексов последних с катионами серебра. Он пригоден для разделения молекул, различающихся по числу двойных связей и их конфигурации (*цис*- и *транс*-изомеры). Баррет и сотр. [23] готовили суспензию, смешивая 30 г силикагеля G с 60 мл 12,5 %-ного водного раствора нитрата серебра. Моррис [19] вначале наносил нитрат серебра на уже готовую пластинку с помощью пульверизатора, однако позднее [218] он также готовил суспензии, смешивая 23,7 г силикагеля G с 50 мл раствора, содержащего

1,25 г нитрата серебра, с тем чтобы получить адсорбент с 5 %-ным содержанием серебра. По данным этого автора, адсорбент с 2 % серебра позволяет получить столь же хорошее разделение, как и адсорбент с 20 и 30 % серебра. Воспроизводимость результатов, полученных на пластинках, приготовленных с использованием суспензии, содержащей нитрат серебра, выше,

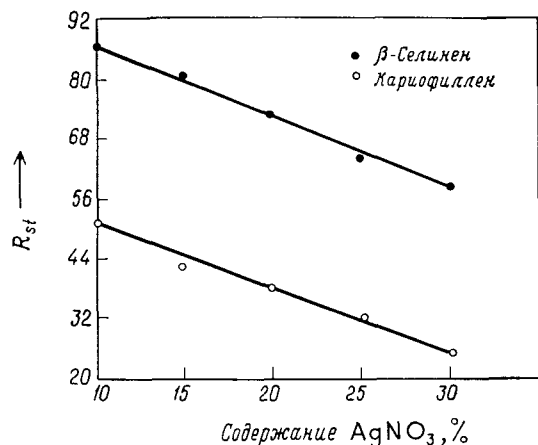


Рис. 3.1. Зависимость R_{st} от содержания нитрата серебра в силикагеле. $R_{st} = [R_f \text{ соединения} / R_f \text{ стандарта (красителя)}]$ [119] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.).

чем на пластинках, опыленных раствором нитрата серебра. Пржбылович и сотр. [219] пропитывали тонкие слои адсорбента на пластиковых подложках, погружая их в раствор нитрата серебра.

Гупта и Дев [119] нашли, что хотя значение R_f различных соединений меняется в зависимости от содержания нитрата серебра на адсорбенте, отношение величин R_f двух соединений остается почти постоянным (рис. 3.1).

Поскольку некоторые растворители, применяемые при разделении гетероциклических азотсодержащих соединений на адсорбентах, пропитанных нитратом серебра, смывают комплексобразователь со слоя, Табак и Верзола [220] исследовали возможность применения в качестве комплексобразователя в ТСХ оксида серебра. Этот же подход был применен также в хроматографии некоторых карбоновых кислот и аминов [221]. Оказалось, что пластинки с оксидом серебра весьма удобны, поскольку их можно применять с более полярными растворителями, чем пластинки, пропитанные нитратом серебра. Приготавливают пластинки с оксидом серебра следующим образом. Силикагель смешивают с 5 %-ным раствором нитрата серебра

Таблица 3 6

Значения $R_f \times 100$, полученные методом ТСХ для различных фенолкарбоновых кислот на кизельгеле G (необработанном и обработанном натриевыми солями хелатообразующих анионов) [222] ^а

Система растворителей б	Слой обработан	Кислота									
		ванилиновая	протокатеховая	гваялдусовая	гомопротокатеховая	гваялпропиевая	дигидрооксифеновая	феруловая	кофейновая	изоферуловая	хлорогеновая
1	Не обработан	92	95	93	91	92	95	96	95	93	50
	Na ₂ MoO ₄	95	76	89	68	87	69	87	61	85	10
	Na ₂ WO ₄	88	59	80	61	84	91	90	85	89	06
	Бура	82	57	78	51	77	64	82	61	82	22
2	Не обработан	73	38	60	36	57	39	61	42	64	02
	Na ₂ MoO ₄	91	32 ^в	84	37 ^в	84	42 ^в	81	47 ^в	82	02
	Na ₂ WO ₄	50	11	34	10	34	19	39	12	41	00
	Бура	42	15	43	13	42	16	49	16	53	00
3	Не обработан	72	31	54	22	50	27	53	25	53	00
	Na ₂ MoO ₄	80	31 ^в	71	31 ^в	68	39	73	34	65	00
	Na ₂ WO ₄	47	04	38	03	37	11	41	02	39	00
	Бура	56	02	47	03	43	10	49	05	45	00
4	Не обработан	45	38	29	23	34	27	35	31	30	01
	Na ₂ MoO ₄	44	10	22	06	29	14	34	14	25	00
	Na ₂ WO ₄	39	24	24	13	32	19	36	22	31	00
	Бура	34	10	18	05	25	09	28	08	25	00
5	Не обработан	82	81	59	55	56	57	63	65	60	08
	Na ₂ MoO ₄	93	71	69	66	84	80	87	85	86	14
	Na ₂ WO ₄	38	15	19	13	29	23	37	31 ^в	33	10
	Бура	53	04	21 ^в	03	40	03	50	02	45	00

^а С разрешения автора и издательства.

^б Разделение проводилось при использовании следующих систем растворителей: 1) органический слой смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5); 2) бензол—метанол—уксусная кислота (45:8:4); 3) бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:1); 4) *n*-бутиловый эфир (насыщенный водой)—уксусная кислота (10:1); 5) этилацетат—изопропанол—вода (65:24:11).

^в Продолговатое пятно.

с таким расчетом, чтобы в конечной твердой фазе содержание нитрата серебра составило 5%. К смеси постепенно при тщательном перемешивании добавляют стехиометрическое количество 5%-ного раствора гидроксида натрия. После нанесения адсорбента пластинки сушат 45 мин при 105—110°C.

В качестве комплексообразователей испытаны и другие соединения. Холмекоски [222, 223] изучил влияние ряда комплексообразователей на разделение фенолкарбоновых кислот и производных адреналина (табл. 3.6 и 3.7). В табл. 3.8 показаны

Таблица 3.7

Значения $R_f \times 100$, полученные методом ТСХ для различных производных адреналина на кизельгеле G, забуференном до pH 4, и на кизельгеле G с добавкой натриевых солей различных хелатообразующих анионов [223] ^a

Система растворителей ^b	Слой обработан	Адреналин	Окседрин	Норадреналин	Адренон	Корбарлин	Оксамфетамин	Изопреналин	Метакседрин	3-Оксигирамин
1	Не обработан	27	35	41	38	57	69	45	44	53
	Na ₂ MoO ₄	06	40	12	06	14	71	11	47	17
	Na ₂ WO ₄	05	48	06	05	12	72	14	53	12
	Бура	15	38	14	07	18	51	20	40	28
2	Не обработан	33	42	52	41	56	64	48	48	54
	Na ₂ MoO ₄	10	40	13	10	21	66	21	50	25
	Na ₂ WO ₄	18	45	17	08	27	71	34	53	29
	Бура	27	56	30	17	37	73	40	61	46
3	Не обработан	27	30	34	27	38	48	31	34	37
	Na ₂ MoO ₄	05	35	14	06	19	56	17	39	19
	Na ₂ WO ₄	09	36	17	08	22	60	20	40	21
	Бура	13	34	20	16	22	60	20	36	23
4	Не обработан	42	45	52	45	60	67	58	51	56
	Na ₂ MoO ₄	22	47	25	16	31	64	24	47	24
	Na ₂ WO ₄	24	50	30	19	36	64	31	52	31
	Бура	28	55	36	24	42	73	46	61	42

^a С разрешения автора и издательства.

^b Для проявления хроматограмм использовались органические слои следующих смесей растворителей: 1) *n*-бутанол, насыщенный водным раствором диоксида серы (H₂SO₃); 2) *n*-бутанол—уксусная кислота—H₂SO₃ (4:1:5); 3) *n*-амиловый спирт—уксусная кислота—этанол—H₂SO₃ (4:1:1:5).

Таблица 3.8

Некоторые комплексообразователи, используемые для пропитки тонких слоев адсорбентов

Комплексообразователь	Адсорбент	Разделяемые соединения	Литература
Свинца нитрат основной ацетат	Силикагель	Полиолы	224
	„	Сахара, антоцианы, антоцианидины	225
Марганца ацетат формиат	„	Ароматические амины, фосфолипиды	226, 227, 228
	„	Ароматические амины	226
Mn·Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	„	То же	226
Таллия (I) нитрат	„	Монотерпеновые углеводороды	229
Кадмия сульфат ацетат фосфат	„	Ароматические амины	230, 231
	„	То же	231
	„	„	231
Цинка хлорид нитрат	„	Хлорированные анилины	122
	„	То же	122
	Силикагель силицизованный	„	122
Железа (III) хлорид	Силикагель	Стероиды	232
	„	Производные оксина	233
Меди сульфат	„	Гексозамины	234
CuCO ₃ ·Cu(OH) ₂	Целлюлоза	Аминокислоты	235
Молибденовая кислота	Силикагель	Углеводы	236, 237
Вольфрамовая кислота	„	Олигосахариды	237
	Оксид алюминия	„	237
Борная кислота	Силикагель	Липиды	238—240, 241, 242
	„	Углеводы	236, 237, 243, 244—247
	„	Тритерпеноиды	248
	„	Полиоксикислоты	249
Щавелевая кислота	„	Азулены	250
	„	Инсектициды	251
	„	Неионные детергенты	252

Продолжение табл. 3.8

Комплексообразователь	Адсорбент	Разделяемые соединения	Литература
		Свободные жирные кислоты	253
Пикриновая кислота	Силикагель	Полициклические углеводороды	254, 255
Натрия молибдат	"	Фенолкарбоновые кислоты	222
	"	Производные адреналина	223
	"	Флавоноловые гликозиды	256
Натрия вольфрамат	"	Фенолкарбоновые кислоты	222
	"	Производные адреналина	223
	"	Флавоноловые гликозиды	256
Натрия тетраборат	"	Нуклеотиды	257, 258
	"	Липиды	259—264
	"	Углеводы	236, 237, 265
ЭДТА	"	Антибиотики	266, 267
	"	Производные 8-оксихинолина	268
Натрия арсенит	"	Полиспирты	269—271, 249
Мочевина	"	Углеводородный воск	272
	Оксид алюминия	Пластификаторы	273
Пикриламид	Силикагель	Амины	274
	Кремневая кислота + силикат магния	"	274
2,4,6-Тринитроанизол	Силикагель	"	274
<i>m</i> -Динитробензол	"	"	275
2,4,6-Тринитротолуол	"	"	275
Тринитробензол	"	Полициклические углеводороды	276, 277
2,4,7-Тринитрофлуорен-9-он	"	То же	255, 276
Пиромеллитовый диангидрид	"	"	278, 279

Продолжение табл. 3.8

Комплексообразователь	Адсорбент	Разделяемые соединения	Литература
Хлоранил	Силикагель	Полициклические углеводороды	279
Тетраметилмочевая кислота	"	То же	279
Кофенин	"	"	255, 279
Бензохинон	"	"	280
Дигитонин	"	Стеронды	281
<i>o</i> -Толуидин	Кремневая кислота + силикат Mg	Ароматические нитросоединения	282
Диметиланилин	То же	То же	282
<i>m</i> -Хлоранилин	"	"	282
2,4,6,2',4',6'-Гексанитродифенилсульфид	Силикагель	Соединения с сопряженными двойными связями	283
	Оксид алюминия	То же	283
2,4,2',4'-Тетранитродифенилсульфид	То же	"	283
NiSO ₄ или CaCl ₂	Оксид алюминия	Алифатические и гетероциклические спирты	284
Диэтил- или дипропил-амин	Силикагель	Каннабиноиды	285
Стрихнин	"	Алкилгаллаты	286
	Кремневая кислота + кизельгур	"	286
Цинхонин	То же	"	286

некоторые примеры применения других комплексообразователей и перечислены типы соединений, для которых они применяются.

Водные суспензии оксида алюминия с алебастром в качестве связующего

Для приготовления суспензий оксида алюминия из готовых адсорбентов, специально предназначенных для ТСХ, фирмы-изготовители рекомендуют следующие пропорции. Суспензии оксида алюминия можно готовить таким же образом, как и суспензии силикагеля. Их можно растирать в ступке или смешивать в колбе при энергичном встряхивании.

Чтобы получить слои толщиной в 1 мм, предназначенные для препаративной хроматографии, Корзун и сотр. [18] готовили суспензию из 110 мл воды и 120 г оксида алюминия

марки G. Хонегер [199] получал слои толщиной от 2 до 5 мм для препаративных целей с применением суспензии, содержащей тот же адсорбент и воду в соотношении 1 : 0,9.

Флуоресцирующий слой оксида алюминия можно получить по методике, разработанной Брокменом и Вольперсом [287, 288] для колоночной хроматографии. Эти авторы адсорбировали на оксиде алюминия морин (пентаметоксифлавон) из расчета 300 мг морина на 500 г адсорбента. Черни и сотр. [289] применили этот флуоресцирующий агент для пропитки адсорбента для ТСХ. Метьюз и сотр. [290] использовали в качестве флуоресцирующего агента зеленый фосфор G. S. 15 фирмы U. S. Radium. На 30 г оксида алюминия марки G наносили 100 мг фосфора. Предварительно фосфор и адсорбент промывали кипящим метанолом порциями по 375 мл с тем, чтобы удалить мешающие примеси. Перед приготовлением суспензии смесь высушивали.

Водные суспензии оксида алюминия с крахмалом в качестве связующего

Крахмал использовался в качестве связующего для оксида алюминия очень редко. Первая такая работа опубликована Мейнхардом и Холлом [1]. Позднее Кирхнер и сотр. [2] испытали пригодность этого адсорбента для разделения терпенов. Петшик и Стегер [291] готовили суспензии, растирая в ступке смесь 28,5 г оксида алюминия и 1,5 г пшеничного крахмала с дистиллированной водой. Отличительная особенность методики, описанной этими авторами, состоит в том, что для желатинизации крахмала они не нагревали смесь перед нанесением ее на подложку, а сначала получали тонкий слой и затем сушили пластинку в печи при 120°C. Попытки желатинизировать крахмал таким способом, проведенные в лаборатории автора, не дали положительных результатов — слой адсорбента оставался мягким.

Водные суспензии оксида алюминия без связующего

Согласно данным фирмы SAMAG, тонкодисперсный оксид алюминия (марки FDO), не содержащий связующего, можно хранить лишь ограниченное время. Через 6—9 месяцев хранения способность порошка прилипать к стеклянной пластинке уменьшается.

Для приготовления суспензии оксида алюминия (кислого, щелочного или нейтрального) фирма Woelm рекомендует брать 35 г оксида на 40 мл воды и наносить суспензию на пластинку с помощью пульверизатора. Если же слой наносится без пуль-

веризатора, рекомендуется брать 6 г адсорбента на 15 мл смеси этанол—вода (9 : 1).

Водные суспензии модифицированного оксида алюминия

Кислый оксид алюминия. Для приготовления суспензии кислого оксида алюминия вполне пригоден продажный кислый адсорбент (приготовление суспензии описано выше), а также оксид алюминия марки G или другой подходящий адсорбент. Адсорбент диспергируют в 0,2 н. растворе соляной кислоты в соотношении 1 г оксида алюминия на 2 мл кислоты [292]. Васюкова и сотр. [293] готовили суспензию оксида алюминия с активностью IV по Брокману, подкисляя суспензию оксида алюминия с активностью I или II до pH 4 соляной кислотой.

Основной оксид алюминия. Оксид алюминия обычно имеет щелочную реакцию, что обусловлено самой методикой его получения. Об этом следует помнить, особенно если щелочная реакция адсорбента нежелательна. У оксида алюминия фирмы SAMAG для ТСХ pH примерно равен 9. Приготовить суспензию можно, смешав 20 г адсорбента с 50 мл дистиллированной воды. Основной оксид алюминия для ТСХ, выпускаемый фирмой Woelm, не содержит связующего, и суспензии этого адсорбента можно готовить по описанной выше методике.

Грёгер и Эрге [294] готовили основные суспензии, смешивая 18 г кислого оксида алюминия с 2 г алебаstra и 40 мл 1 %-ного раствора гидроксида калия.

Оксид алюминия, пропитанный комплексобразователями. О применении комплексобразователей в сочетании с оксидом алюминия сведений пока довольно мало. В работе Морриса [249] упоминается о применении оксида алюминия марки G, пропитанного боратом натрия. Разделение на этом адсорбенте проходило так же, как на силикагеле G, пропитанном тем же реактивом. Суспензию готовили стандартным методом, т. е. воду заменяли на водный раствор комплексобразователя. Зинкель и Роув [295] описали приготовление суспензии оксида алюминия с добавкой нитрата серебра. Они растворяли 12 г нитрата серебра в 20 мл воды, добавляли 40 мл метанола и 30 г оксида алюминия и тщательно перемешивали смесь, энергично ее встряхивая. Урбах [296] получал аналогичную суспензию, диспергируя 30 г оксида алюминия марки G в растворе 7,5 г нитрата серебра в 50 мл воды.

Суспензии силикагеля в органических растворителях. Хотя в большинстве работ для нанесения тонкого слоя адсорбента на подложку используются водные суспензии, некоторые авторы применяли суспензии на основе органических раствори-

телей. Так, Мюллер и Хонерлейген [297] диспергировали 16 г силикагеля G в 30 мл ацетона. Приготовленные из такой суспензии слои были более ровными, а пятна более четкими. Прохазка [298] располагает данными о том, что Йошка с помощью пневматического распылителя наносил на стеклянные пластинки суспензию, содержащую 25 г смеси силикагеля с сульфатом кальция в 90 мл 60 %-ного ацетона. Дункан [299] пользовался суспензией, содержащей 1 часть силикагеля G в 2 частях смеси метанол—вода (1:1). Синклер и Лерфельд [300] готовили суспензию адсорбента на основе 10—50 %-ного (по объему) этанола, чтобы устранить плохое смачивание стекла, загрязненного силиконовой смазкой. Хёрхеммер и сотр. [301] готовили пластинки для ТСХ, непосредственно наливая на стеклянные подложки суспензию, содержащую одну весовую часть силикагеля фирмы Woelm на три объемные части этилацетата или ацетона. Согласно данным авторов [301], при применении хлороформа, бензола, петролейного эфира, метанола или изопропанола получались плохие результаты либо из-за малой летучести этих растворителей, либо вследствие образования рыхлых слоев. (Силикагель фирмы Woelm не содержит связующего.) Сильно разбавленные суспензии на основе органических растворителей образуют у края пластинок зону, свободную от адсорбента. Бхандари и сотр. [302] (фирма Woelm) рекомендуют брать 6 г силикагеля этой фирмы на 15 мл смеси этанол—вода (9:1).

Для приготовления слоев, получаемых погружением предметных или проекционных стекол в суспензию, Пейфер [4] рекомендует диспергировать 35 г силикагеля G в 100 мл хлороформа или смеси хлороформ—метанол (2:1). Для введения непосредственно в суспензию концентрированной серной кислоты этот автор смешивал 45 г кремневой кислоты (100 меш) с 5 г алебаstra и диспергировал смесь в 102,5 мл раствора, содержащего хлороформ, метанол и концентрированную серную кислоту (70:30:2,5). Чтобы алебастр затвердел, пластинки обрабатывали водяным паром. Для покрытия слоем адсорбента стенок пробирок Ли и Ник [61] брали суспензию, содержащую 1 г кремневой кислоты на 2,5 мл хлороформа.

Суспензии оксида алюминия на основе органических растворителей. Пейфер [4] готовил суспензии оксида алюминия, растирая в ступке смесь 45 г порошка активного оксида алюминия и 15 г алебаstra с небольшим количеством смеси хлороформ—метанол (70:30). После тщательного перемешивания объем смеси доводили растворителем до 100 мл. Пластинки окунали в суспензию и после испарения растворителя обрабатывали водяным паром, чтобы обеспечить затвердевание алебаstra.

Суспензии различных неорганических адсорбентов

Сульфат кальция. Мейтис и сотр. [150] диспергировали 20 г сульфата кальция без связующего в 100 мл воды, энергично встряхивая смесь. Полученную суспензию наливали на пластинки. Сульфат кальция готовили осаждением, добавляя к хлориду кальция серную кислоту. Осадок тщательно промывали, сушили 48 ч при 115—120°C, после чего измельчали в тонкий порошок. Авторы использовали этот адсорбент для разделения кортикоидов.

Оксид и гидроксид магния. Шварц и сотр. [303] и Шварц и Перкс [304] готовили суспензию путем диспергирования 15 г частично дезактивированного оксида магния и 6 г целита 545 в 50 мл 95 %-ного этанола. Компоненты смеси помещали в колбу Эрленмейера объемом 125 мл с притертой стеклянной пробкой и энергично встряхивали 5 мин. Оксид магния (сисорб 43 фирмы Fisher) нагревали 16 ч при 525°C в муфельной печи. На пластинках с этим адсорбентом проводили разделение 2,4-динитрофенилгидразонов карбонильных соединений.

Николайдис [305] испытал оксид магния нескольких марок и нашел, что удовлетворительные тонкослойные пластинки дает адсорбент MX-66 марки «каталитический» фирмы Matheson, Coleman and Bell (200 меш). Он диспергировал 20 г этого адсорбента или смеси адсорбента со связующим (CaSO₄) в соотношении 9:1 в 40 мл воды. Полученные из такой суспензии слои сушили на воздухе, после чего активировали в течение 2 ч при 180°C. Связующее предотвращало отслаивание адсорбента при дальнейшей работе с пластинками. Снайдер [306] исследовал хроматографическое поведение оксида магния, дезактивированного водой. Он указывает, что основное различие между оксидами магния и алюминия состоит в том, что на оксиде магния сильнее адсорбируются соединения, содержащие двойную связь углерод—углерод. Оксид магния адсорбирует олефины и ароматические соединения сильнее, чем другие адсорбенты.

Кифер [307], Кифер и Джонсон [308] предложили в качестве адсорбента для ТСХ гидроксид магния. Они диспергировали 100 г гидроксида магния (фирмы Fisher) в 150 мл воды. Этот адсорбент, по-видимому, характеризуется большой сорбционной емкостью.

Силикаты кальция, магния и алюминия. Тоур [309, 310] описал разделение сахаров и фенилозанонов на силикате кальция. Для приготовления пластинок он готовил суспензию силена EF (гидратированный силикат кальция фирмы Pittsburgh Plate Glass) или смеси силена EF с промытым кислотой

целитом 535. Смесь 11 г силена EF, 3 г целита 535 и 700 мг ацетата натрия диспергировали в воде, количество которой в работах точно не указано. Уолфром и сотр. [141] готовили суспензию силиката магния, диспергируя в 55 мл воды 20 г специально приготовленного магнезола (см. разд. 2), содержащего 13 % алебаstra. На этом адсорбенте разделяли ацетильные и метилные производные сахаров.

Для получения неводной суспензии Пейфер [4] растирал в ступке смесь 45 г флорисила (флоридина) (60—100 меш) и 10 г алебаstra с 1 мл ледяной уксусной кислоты и небольшим количеством смеси хлороформ—метанол (70:30). Далее суммарное содержание растворителя в суспензии доводили до 101 мл. Пластинки окунали в суспензию и обрабатывали водяным паром. Хикок и Мейхон [10] готовили суспензию 10 г силиката алюминия (с добавкой 3 % алебаstra) в 20 мл воды. На этом адсорбенте проводили хроматографическое разделение оксискатолов.

Диатомитовая земля. Фирма Merck, производящая кизельгур G, рекомендует брать 30 г адсорбента на 60 мл воды. В диатомит этой марки в качестве связующего вводят алебастр. Ведтке и Гаевска [311] использовали целит 545 (фирма Johns Manville). Диатомит и алебастр просеивали через сито DIN-1171 (размер отверстия 0,07 мм) и диспергировали смесь 7 г целита и 0,4 г алебаstra в 40 мл воды. Ввиду малой адсорбционной способности диатомитовой земли ее чаще применяют в качестве твердого носителя в распределительной хроматографии. Так, Кнаппе и Петери [312] готовили кизельгур, пропитанный жидкой фазой, непосредственно вводя последнюю в суспензию. Они получали слои из смеси, содержащей 30 г кизельгура G, 0,3 г диэтилдитиокарбамина натрия, 50 мл воды и 10 г полиэтиленгликоля M 4000. Для получения слоев забуференного диатомита 30 г диатомитовой земли диспергировали в 60 мл соответствующего буферного раствора. Прей и сотр. [313] диспергировали смесь силикагеля с кизельгуром (1:4) в буферном растворе, содержащем 0,02 моль/л ацетата натрия. На таком смешанном адсорбенте углеводы разделялись лучше, чем на забуференном кизельгуре. Бейдингс и Уоссинк [314] готовили пластинки с кизельгуром G в 58 мл воды, содержащих 7,5 г нитрата серебра. На этих пластинках разделялись на классы 2,4-динитрофенилгидразоны алифатических альдегидов и кетонов.

Фосфат кальция (оксиapatит). Хофман [11, 138, 139, 315] ввел в употребление оксиapatит в качестве адсорбента для разделения липидов и белков. Связующими при этом служили алебастр и цитель-61 (растворимый нейлон фирмы Du Pont). Нейлон (40 мг) растворяли в 60 мл 70 %-ного этанола при

нагревании и перемешивании. После охлаждения раствора добавляли 15 г оксиapatита и тщательно перемешивали до получения однородной суспензии. Поскольку введение алебаstra в качестве связующего улучшает разделение, 15 г оксиapatита смешивали с 1,2 г алебаstra и диспергировали в 60 мл воды, энергично встряхивая смесь в закрытой склянке. Гомогенизацию можно осуществить также с помощью электрической мешалки с большим числом оборотов. По-видимому, наилучшее разделение достигается при добавлении 7 % алебаstra. Однако липиды на оксиapatите разделяются хуже, чем на силикагеле. Оксиapatит, пропитанный нитратом серебра, можно приготовить, диспергируя его не в воде, а в 40 %-ном растворе нитрата серебра [239].

Карбонат цинка. Бейдингс [316] и Бейдингс и Уоссинк [314] использовали пластинки с основным карбонатом цинка с добавкой 5 % крахмала в качестве связующего для разделения 2,4-динитрофенилгидразонов. Суспензию приготавливали из 19 г основного карбоната цинка и 0,5 г крахмала в 50 мл воды. Для желатинизации крахмала смесь осторожно нагревали на водяной бане.

Эйзенберг и сотр. [317] диспергировали 25 г карбоната цинка с добавкой 5 % растворимого крахмала в 70 мл воды. Эти авторы приготовили также элюотропные ряды растворителей для карбоната цинка.

Углерод. Бродески [318] диспергировал 30 г препарата нучар-C-190-N (карбонизованная сажа растительного происхождения, выпускаемая фирмой West Virginia Pulp and Paper Co.) и 1,5 г алебаstra в 220 мл дистиллированной воды или в дистиллированной воде, pH которой был доведен до 2 серной кислотой (если нужно было получить слой подкисленной сажи). Подкисленную суспензию сажи необходимо выдерживать не менее 16 ч и только после этого можно наносить ее на пластинки. Кирхнер и Фленеган [179] выбрали в качестве связующего крахмал. Применявшаяся ими суспензия содержала 19 г активного угля нучар C-N и 2 г крахмала клинко-15 (фирма Clinton) в 38 мл воды. Прежде чем вводить уголь в суспензию, его рекомендуется промыть ацетоном, чтобы удалить адсорбированные примеси. Хессе и Александр [319] готовили тонкослойные пластинки, нанося суспензию графита. Прохазка [320] диспергировал 20 г активного угля с добавкой 2 г полиэтилена в качестве связующего в метилхлориде (100—150 мл).

Стекланный порошок. В 1962 г. Рахандраха [321] описал тонкослойную хроматографию на стекланных порошках. В работе [322] приведены методы обработки стекланных порошков и приготовления из них тонких слоев без применения связующего. Стекланный порошок (1 кг), просеянный через сито

с размером отверстий 0,05 мм, диспергируют в 2 л дистиллированной воды и оставляют в этой воде на час. После этого сливают воду, промывают порошок 2 л 5 %-ной уксусной кислоты, оставляют еще на час, снова сливают жидкость, вновь промывают таким же объемом воды, сливают воду и сушат порошок при 140°C. Для нанесения порошка на пластинки можно приготовить густую суспензию на основе воды или смеси вода—пропанол (4:1). Бруд [323] описал применение в ТСХ порошка иенского стекла.

Крамер и сотр. [324] использовали порошкообразное пористое стекло, удельная поверхность у которого больше, чем у порошка обычного стекла. Получали такой адсорбент следующим образом. Размалывали пластинки пористого стекла № 7930 фирмы Corning Glass до зерен размером 200—250 меш и добавляли к нему 13 % алебаstra, выполнявшего роль связующего. Готовые пластинки сушили 3 ч при 130°C. На этих пластинках проводили разделение восков. В трех приведенных примерах на пористом стекле разделение было лучше, чем на силикагеле G или оксиде алюминия: пятна были более четкими, и в некоторых случаях на хроматограмме появлялись дополнительные пятна. Уолф и сотр. [325] добавляли к стеклянному порошку 5 % гипса в качестве связующего и активировали пластинки при 200°C. Согласно данным [325], разделение зависит от температуры активации. Марино [326] опубликовал обзор по применению пористого стекла в тонкослойной и колонной хроматографиях и сравнил имеющиеся результаты с результатами разделения на силикагеле. В большинстве случаев силикагель позволяет получить лучшее разделение.

Суспензии органических полимеров

Полиамиды. Фирмы, производящие полиамид для ТСХ, рекомендуют для приготовления суспензии брать 5 г порошка полиамида на 45 мл этанола или метанола. Эти порошки, разумеется, не содержат никакого связующего. Если слой наносят не с помощью пульверизатора, а просто наливают суспензию на пластинку, то в этом случае фирма Woelm рекомендует пользоваться суспензией, содержащей 1 г полиамида в 13,5 г этанола. Первыми полиамидный порошок в ТСХ применили Уонг [327], Эггер [328] и Давидек и сотр. [329, 330]. Последние авторы проводили хроматографирование на незакрепленных слоях по Мотье и Поттерату [331]. Уонг и сотр. [332] применили модифицированный метод нанесения слоя. Они растворяли 20 г полиамидной смолы в 100 мл 75 %-ной муравьиной кислоты и каждые 15 мл полученного вязкого раствора распределяли ровным слоем на поверхности четырех сте-

клянных пластинок размером 15×15 см. Пластинки выдерживали в насыщенной водяными парами атмосфере в течение двух дней при температуре 25±2°C, после чего нагревали 15 мин при 100°C, чтобы удалить следы муравьиной кислоты. При приготовлении пластинок с полиамидным слоем в качестве растворителя пригодны также пропилен- или этиленгликоль [333]. В этом случае нейлон растворяют при температуре выше 100°C и приготавливают 10 %-ный (по массе) раствор, в который затем погружают стеклянные пластинки. Юрион и сотр. [334, 335] добавляли к полиамиду крахмал в качестве связующего. Они нагревали 1,5 г рисового крахмала в 54 мл воды в течение 2—3 мин, добавляли еще 30 мл воды, нагревали до 80°C, охлаждали до 50—60°C, добавляли 9,5 мл полиамида, гомогенизовали смесь 30 с и затем наливали ее в пульверизатор. Для получения ровного твердого слоя Нордби и сотр. [336] добавляли к смеси силикагель. Они готовили смесь, содержащую 0,8 г рисового крахмала, 0,4 г силикагеля (очень тонкий порошок № 1 фирмы Fisher) и 9 мл воды, и нагревали ее 40 мин на паровой бане, периодически перемешивая. стакан накрывали стеклом и добавляли еще 1—2 мл воды, чтобы предотвратить образование корки на стенках. Далее содержимое стакана смывали 3 мл воды в сосуд, содержащий раствор 5,5 г полиамидного порошка фирмы Woelm в 35—40 мл метанола. Перемешивание в течение 3 мин в смесителе фирмы Waring позволяет получить слой с наиболее ровной поверхностью. Приготовленные таким образом пластинки сушили 2 ч при комнатной температуре. Уогнер и сотр. [337] использовали в качестве связующего целлюлозу. Они перемешивали в смесителе 12 г полиамида и 2,4 г целлюлозы с 40 мл метанола.

Рёслер и сотр. [338] описали методику приготовления стандартизованного мелкозернистого полиамида путем контролируемого гидролиза полиамидных таблеток или порошков. Полученную этим методом суспензию можно предохранить от плесневения, если добавить к ней несколько миллилитров хлороформа или хранить ее в высушенном виде.

Поливинилпирролидон. Нерастворимый поливинилпирролидон (ПВП) также образует водородные связи с карбоксильными и фенольными гидроксильными группами и, следовательно, может оказаться очень полезным адсорбентом. Куормби [339] готовил суспензию, встряхивая 15 г ПВП (100—300 меш) с 80 мл воды. Чтобы избежать осаждения, суспензию наносили на пластинки сразу же после введения ее в аппликатор, позволяющий наносить слой толщиной 500 мкм. Морено Дальмау и сотр. [340] измельчали и просеивали поликлар АТ (фирма General Anilin and Film) с тем, чтобы получить порошок с частицами менее 40 мкм. Для приготовления суспензии брали

8 г порошка на 49 мл изопропанола. Позднее те же авторы [341] использовали суспензию, содержащую 6 г порошка с частицами размером 37—53 мкм в 37,5 мл безводного изопропанола. Лумис и Беттейл [341a], чтобы очистить ПВП (поликарлат АТ), кипятили его 10 мин в 10 %-ной соляной кислоте, после чего промывали перегнанной в стеклянном дистилляторе водой и ацетоном.

Во всех случаях не содержащие связующего пластинки сушились в течение ночи при комнатной температуре.

Клиффорд [342] добавлял к 12 г готового ПВП с размером зерен менее 100 меш 2,4 г алебаstra в качестве связующего. Порошки смешивали сухими и затем диспергировали в 96 мл воды. Слои, полученные из этой суспензии, сушили 15 мин при комнатной температуре и 30 мин при 105°C.

Другие органические полимеры. Поропак — фирменное название группы полимеров, выпускаемых фирмой Waters Associates для газовой хроматографии. Янак и сотр. [343—345] испытали пригодность некоторых поропаков для ТСХ. Слой поропака Q (100—120 меш), полимера этилвинилбензола с дивинилбензолными поперечными шшивками, наносили на стеклянные подложки холодным прессованием [344]. Испытаны также поропаки N и P. Поропак T (этилвинилдивинилбензол, модифицированный полярными мономерами) наносили на пластинки в виде суспензии в пропаноле (2:5 по массе) [345].

Певикон С-870 (сополимер поливинилхлорида с поливинилацетатом, поставляемый фирмой Merck Chemical Corp.) использовался для электрофореза, поскольку этот сополимер почти не проявляет электроосмотических эффектов и не взаимодействует с белками. Для приготовления суспензии 50 г этого материала диспергируют в 100 мл буферного раствора, приготовленного из 0,0365 М раствора трис-(оксиметил)аминометана, 0,0365 М раствора малеинового ангидрида и 0,05 М раствора гидроксида натрия. Получив гомогенную суспензию, ей дают постоять 4 мин, а затем отбирают сверху 50 мл жидкости. Полученную густую суспензию наливают на стеклянные пластинки размером 11×20 см.

Рааен [347, 348] проводил разделение методом ТСХ на политетрафторэтилене (флуороглайд 200 марки TWO 218 фирмы Chemplast). Суспензии можно готовить в различных органических растворителях, соотношение твердой фазы и растворителя равно 1:3 (масса/объем). Можно приготовить также и водную суспензию, если ввести в нее для улучшения смачивания фторорганический поверхностно-активный препарат FX-173 (фирма 3M Company, филиал в Атланте, Industrial Chemicals Division). В работе [349] описано приготовление пластинок со смешанными полимерными адсорбентами. Для

их получения готовили суспензию, содержащую 20 г порошкообразного эйвамида-6 (микрористаллический найлон, изготовитель — Chemical Research and Development Center, FMC Corp.) и 5 г флуороглайда в 75 мл *n*-пропанола.

В качестве адсорбента в ТСХ был испытан и поливинилацетат [350]. Различные количества (от 0,5 до 4 г) поливинилацетата растворяли в смеси 25 мл метанола и 15 мл этилацетата, доводили объем раствора метанолом до 60 мл и диспергировали в растворе 25 г кизельгура G. После нанесения полученной суспензии на пластинки слой сушили 3 ч при комнатной температуре (все оборудование, находившееся в контакте с суспензией, необходимо сразу же протирать метанолом).

Хессе и сотр. [351] сравнили адсорбционные свойства полиакрилонитрила, полиакриламида, *N*-ацетилполиакриламида и полиамида и нашли, что все эти полимеры пригодны для разделения водорастворимых соединений, поскольку они способны образовывать водородные связи.

Эптон и сотр. [352] синтезировали и испытали ряд сшитых поли(акрилоилморфолинов) в качестве носителей для гелевой хроматографии.

Смесь полиакрилонитрил—перлон. Бёркофер и сотр. [192] проводили разделение антоцианов на тонкослойных пластинках со смесью полиакрилонитрила и перлона (поликапролактама). Они наносили на пластинки суспензию, содержащую смесь этих полимеров (7:2) в 40 мл 0,05 М раствора первичного фосфата кальция.

Мочевиноформальдегидные смолы. Эрдельт и Ланге [353] использовали тонкослойные пластинки с мочевиноформальдегидной смолой. Для их приготовления 7 г смолы диспергировали в 15 мл смеси метанол—вода (1:6). Никакого связующего в адсорбент не вводили. На этих пластинках проводили разделение тиомочевины и ее производных.

Сефадекс. Детерман [354], Уиланд и Детерман [355] и Иоханссон и Раймо [356] применили в ТСХ сшитый полисахарид сефадекс. В том же году Доуз и Краузе [357] использовали сефадекс в тонкослойном электрофорезе. Детерман промывал сефадекс G-25 (200—400 меш, фирма Pharmacia) и диспергировал 7 г его в воде до получения подвижной пасты. Уиланд и Детерман [355] наносили на пластинки суспензию DEAE—сефадекса A-25 (200—400 меш) марки «тонкий», который последовательно обрабатывали 0,5 н. соляной кислотой, водой, 0,5 н. раствором гидроксида натрия и снова водой. Доводили pH суспензии до требуемой величины, добавляя кислоту, входящую в состав буферного раствора. Иоханссон и Раймо диспергировали 10 г сефадекса G-25 в 50 мл 0,1 н. раствора хлорида натрия или в подходящем буферном растворе

за час до нанесения суспензии на пластинки. При нанесении сефадекса G-75 марки «тонкий» (или сефадекса G-75 с размером зерна 400 меш и менее) 5 г геля всыпали в 70 мл буферного раствора и периодически перемешивали в течение 5 ч. Обычно буферным раствором служил 0,02 М раствор фосфата натрия с добавкой 0,2 моль/л хлорида натрия (рН 7,0). Иоханссон и Раймо [358] использовали сефадекс G-50 и G-75 для разделения низкомолекулярных белков, а сефадексы G-100 и G-200 для разделения высокомолекулярных белков. Эти авторы приготавливали пластинки с сефадексом и проводили разделение методом нисходящей хроматографии. На окончательном этапе подготовки сефадекса к разделению по поверхности пластинки в течение не менее чем одного часа пропускали ток буферного раствора.

Те же авторы [359] проводили на сефадексах G-100 и G-200 двумерное разделение соединений, входящих в состав сыворотки крови человека. При этом в одном направлении проводили разделение методом гель-фильтрации, а в перпендикулярном направлении — разделение методом электрофореза. Моррис [360, 361] разделял на сефадексах G-100 и G-200 белки с молекулярной массой до 180 000. Он кондиционировал сефадекс в течение 48 ч, а затем выдерживал пластинки в проявительной камере 18 ч для достижения равновесия. В 1962 г. Доун и Краузе [357] применили сефадекс для тонкослойного электрофореза белков. Сефадекс G-50 («тонкий») смешивали с избытком буферного раствора (1:7,5) и выдерживали в нем 24 ч, после чего буферный раствор отфильтровывали и полученный гель, который был пластичным, но не жидким, переносили на стеклянные пластинки, снабженные бортиками. Фейзелла и сотр. [362] описали разделение белков на сефадексах G-25, G-100 и G-200. Сефадекс выдерживали при перемешивании 30 мин в подходящем буферном растворе, затем давали смеси отстояться и сливали жидкость. Эту операцию повторяли пять-шесть раз, с тем чтобы общее время контакта с буферным раствором было не менее 48 ч для сефадекса G-25 и не менее 72 ч для сефадексов G-100 и G-200. Вендрили и сотр. [363] увеличивали твердость слоев сефадекса для электрофореза, добавляя к ним агарозу. Для этого 1,25 г агарозы растворяли в 65 мл буферного раствора и осторожно добавляли 4 г сефадекса G-200, 5 г сефадекса G-100 или 6,5 г сефадекса G-75, предварительно приведенных в равновесие с буферным раствором.

Торотолани и Колоши [364] нашли, что на слоях, содержащих смесь сефадекса и силикагеля или сефадекса и целлюлозы, можно проводить разделение методом восходящей хроматографии. Суспензию готовили, смешивая 16 г тонкого сефадекса

G-10 с 4 г силикагеля GF или микрокристаллической целлюлозой. Эти препараты тщательно промывали дистиллированной водой, после чего приводили в равновесие с 45 мл фосфатного буфера (0,05 М, рН 7,0). Суспензию наносили на пластинки и оставляли их в горизонтальном положении в течение одного часа, затем высушивали в токе горячего воздуха. Разделение на таких пластинках проходило значительно быстрее, чем на пластинках с необработанным сефадексом, хотя значения R_f были сравнимыми.

Морган и сотр. [365] обратили внимание на то обстоятельство, что сефадекс содержит цинк в количестве 2—6 мкг на 1 г сухого сефадекса.

Слэгт и Сипмен [365а] использовали метилированный сефадекс, полученный путем обработки очень мелкодисперсного сефадекса диметилсульфатом в растворе гидроксида натрия.

Хашицума и Сасаки [366] разделяли нуклеотиды на диэтиламиноэтилированном сефадексе.

Методом ТСХ на сефадексе можно быстро определить приблизительную молекулярную массу белков и пептидов [354, 360, 363]. Для этого достаточно построить кривую зависимости величин их удерживания от молекулярной массы или, что лучше, от логарифма молекулярной массы [367, 368]. Из рис. 3.2 видно, что удерживание белка на сефадексе коррелируется со стоксовым радиусом молекулы [369, 370].

Полиэтилен. Менгольд [374] осуществил разделение жирных кислот и их метиловых эфиров на пластинках со слоем полиэтилена. Для приготовления таких пластинок готовили суспензию 20 г госталена S (фирма Farbwerke Hoechst) (размер зерна 250 меш) в 50 мл смеси этанол (96 %) — вода (1:1).

Мочевина. Мочевину применяют в ТСХ в качестве адсорбента в тех случаях, когда нужно использовать для разделения явление образования клатратов. Этот адсорбент требует добавки связующего. Храдек и Менчик [375] готовили суспензию, содержащую смесь мочевины с целитом (3:1). Эту смесь диспергировали в метаноле, насыщенном мочевиной, и наносили на стеклянные пластинки со специальными бортиками, чтобы удерживать слой на стекле до полного высыхания. Авторы работы [376] вводили в адсорбент в качестве связующего сульфат кальция. Для приготовления суспензии 25 г сульфата кальция диспергировали в 60 мл раствора мочевины в метаноле. Хорошие слои можно получить при содержании мочевины от 20 до 40 %.

Сахара. Сахар можно использовать как адсорбент для разделения пигментов. В работе [377] описано приготовление суспензии сахарозы: 100 г кондитерской сахарозы, содержащей 3 %

кукурузного крахмала, диспергировали в 130 мл ацетона (марки ч. д. а.). Перемешивание осуществлялось электрической мешалкой с малым числом оборотов. Пластинки с нанесенным адсорбентом перед проведением разделения сушили 2 ч на воздухе. В качестве адсорбента использовался также маннит [378]. Навеску маннита (65 г) диспергировали в 10 мл

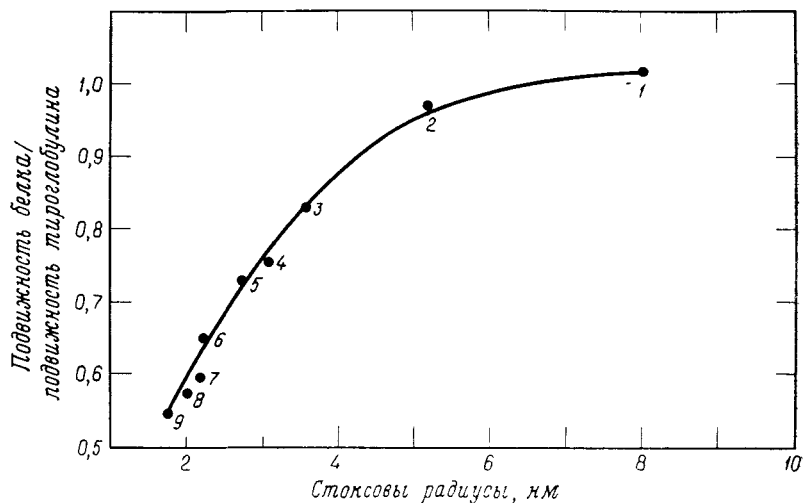


Рис. 32 Стоксов радиус и хроматографическая подвижность белков на слое сефадекса G-100 [372, 373] (Рисунок специально подготовлен П. Фазелла)

Подвижность выражается соотношением между смещением белка и смещением тироглобулина, который не проникает в гель. Стоксовы радиусы вычислены по литературным данным [369, 371]. Приведенные данные заимствованы из работы Эндрыуса [367], а также Фазелла, Гиартозно и Турано. Важно отметить, что белки, подверженные обратной диссоциации, ведут себя на сефадексе аномально. Эту аномальность поведения можно использовать для получения информации о константе диссоциации.

ацетона в течение минуты, добавляли 1 мл 50 %-ного раствора крахмала и перемешивали еще 1 мин. После 20—30-минутной сушки на воздухе пластинка была готова к употреблению.

Крахмал. Для нанесения на пластинку тонкого слоя крахмала готовили суспензию, содержащую 18 г рисового крахмала и 2 г алебаstra в 20 мл 96 %-ного этанола, в которую затем добавляли 40 мл дистиллированной воды [379]. Адсорбентом может служить и кукурузный крахмал, однако его предварительно следует промыть несколько раз водой, содержащей немного хлороформа или четыреххлористого углерода [380]. Эти два вида крахмала имеют разные адсорбционные характеристики.

Суспензии ионитов. Куроива и Хашимото [89] приготовили первыми хроматографические пластинки с ионитами, однако использованный ими цеолит функционировал как адсорбент, а не как ионообменник. Эти авторы диспергировали 150 г цеолита фирмы Dow Chemical (90 меш) и 10 г крахмала в 500 мл дистиллированной воды и нагревали смесь при 80—85°C до желатинизации крахмала. Бергер и сотр. в работе [381] сначала получили пластинки с тонкими слоями анионита дауэкс-1 и катионита дауэкс-50, смешанных в соотношении 1:1 с целлюлозой MN300G, а позднее использовали суспензии, содержащие 5 г целлюлозы MN (фирмы Macherey, Nagel) и 30 г дауэкса на 60 мл воды. Чтобы суспензия была однородной, смесь приходилось растирать в ступке. Гринленд и сотр. [382] обнаружили, что катионит дауэкс-50 и другие катиониты на основе сополимеров стирола и дивинилбензолсульфокислот содержат примесь, дающую цветную реакцию с нингидрином. После промывки смолы гидроксидом аммония окраска исчезает, но вновь появляется, если дать смоле постоять в течение ночи.

Лепри и сотр. [383] готовили хроматографические пластинки с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и альгиновой кислотой в качестве ионообменников. В 40 мл воды диспергировали 4,5 г натриевой соли КМЦ с обменной емкостью 0,89 мэкв./г [383] или 6 г альгиновой кислоты в смеси с 1,5 г целлюлозы [384]. Для той же цели пригодны и многие другие смолы. Декер и Хёллер [385] описали фракционирование ионообменных смол по размерам частиц методом седиментации.

Опубликован ряд статей по применению адсорбентов, пропитанных жидкими ионообменниками. В качестве примеров можно назвать работы Бринкмена и сотр. [386] и Грехема и Карра [387].

Зейбин и Роллинс [388] проводили разделение на неорганических ионообменниках — фосфате циркония и водном оксиде циркония. Оба эти соединения — катиониты, однако последнее в кислой среде проявляет также свойства анионита. Эти иониты можно использовать без связующего, если слой не погружать непосредственно в элюент. В противном случае необходимо добавить 3 % крахмала. (Приготовление суспензий целлюлозных ионообменников описано в разделе, посвященном модифицированным целлюлозам.)

Суспензии порошков целлюлозы. Для нанесения на пластинки различных марок имеющихся в продаже целлюлозных порошков, предназначенных для ТСХ, фирмы-изготовители рекомендуют различные составы суспензий. Так, фирма Serva

рекомендует брать 10 г целлюлозного порошка на 60—80 мл воды, фирма SAMAG — 10 г на 65 мл воды, фирма Whatman — 30 г на 75 мл воды. Суспензии можно готовить, встряхивая смесь в закрытой склянке, однако 30-секундное механическое перемешивание позволяет получить более однородную суспензию. Рёссел [389] добавлял к целлюлозе крахмал в качестве связующего. Он нагревал 0,3 г кукурузного крахмала в 90 мл воды до желатинизации крахмала, после охлаждения добавлял 15 г целлюлозного порошка фирмы Schleicher and Schuell (марка 140DG или 142DG) и тщательно перемешивал 30 с с помощью механической мешалки. Сравнение пластинок с целлюлозой упомянутой фирмы с приготовленными по тому же способу пластинками, содержащими целлюлозу других фирм, показало, что в первом случае для проявления хроматограммы достаточно 50 мин, тогда как в остальных случаях для этого требуется от 2,5 до 6 ч. Кнаппе и сотр. [390] приготавливали пластинки с целлюлозой, пропитанной жидкой фазой. Для приготовления суспензии они брали 15 г целлюлозного порошка марки MN300G, 6,2 г 80—82 %-ного раствора полиэфир адипиновой кислоты и триэтиленгликоля (полиэфир IK-123 фирмы Glasurit-Werk) в метилгликоле и 0,05 г натриевой соли диэтилдитиомочевины на 35 мл воды и 35 мл спирта. Рендерат [391] и Рендерат и Страк [392] готовили целлюлозные суспензии, диспергируя 10 г целлюлозного порошка в 50—60 мл ацетона (связующее в смесь в этом случае не вводили). Пейфер [4] наносил слой адсорбента на пластинки, окуная их в суспензию адсорбента. Оч готовил для этой цели суспензию, растирая в ступке 35 г целлюлозы и 15 г алебаstra с минимальным количеством метанола. Швейгер [393] пользовался суспензией порошка целлюлозы, предварительно обработанной 0,5 %-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) для удаления мешающих катионов. Хаммершмидт и Миллер [155], чтобы удалить мешающие ионы, нагревали целлюлозу 2 ч с обратным холодильником при 50°C в 1,5 %-ном растворе азотной кислоты, затем отфильтровывали адсорбент, тщательно промывали водой и после этого использовали для приготовления суспензии. Мадаева и Ризкова [394] предварительно обрабатывали целлюлозный порошок 2 %-ной соляной кислотой. Уолфром и сотр. [394а] получали восстановленную целлюлозу: 50 г целлюлозного порошка диспергировали в 1 л 0,1 н. водного раствора борогидрида натрия путем 10-часового механического перемешивания при 25°C. После отстаивания жидкость сливали и повторяли операцию со свежим раствором борогидрида. Полученный таким образом продукт тщательно промывали и сушили над пятиокисью фосфора, после чего растирали в ступке в тонкий порошок.

Суспензии модифицированной целлюлозы

DEAE-целлюлоза. Суспензии диэтиламиноэтилцеллюлозы (DEAE-целлюлозы) можно приготовить, диспергируя 10 г целлюлозного ионита в 60—80 мл воды путем энергичного встряхивания в закрытой колбе Эрленмейера. Однако механическое перемешивание дает более однородные суспензии. Коффей и Ньюбург [395] готовили суспензии DEAE-целлюлозы с добавкой 5 % сульфата кальция в качестве связующего. Они смешивали равные количества целлюлозы MN марок 300-DEAE и 300G/DEAE (последняя содержала 10 % сульфата кальция). При разделении некоторых продуктов разложения нуклеиновых кислот на целлюлозе с добавкой сульфата кальция были получены лучшие результаты, чем на чистой целлюлозе без связующего. Бёрниг и Рейнике [396] обнаружили, что DEAE-целлюлоза содержит примеси, поглощающие в той же УФ-области, что и нуклеотиды. Поэтому эти авторы очищали целлюлозу от примесей, взбалтывая 10 г ее в течение 30 мин в 250 мл 1 н. соляной кислоты. Суспензию отфильтровывали на стеклянном фильтре. Такую обработку проводили четыре раза, после чего промывали целлюлозу водой до нейтральной реакции фильтрата.

ЕСТЕОЛА-целлюлоза. Этот материал представляет собой глабый анионообменник, образующийся в результате сшивки целлюлозы триэтаноломином в присутствии эпихлоргидрина. Рендерат [184, 397] использовал этот препарат для разделения нуклеотидов. Для приготовления суспензии этот автор брал 10 г порошка препарата на 60—70 мл дистиллированной воды.

PEI-целлюлоза. Рендерат [398] предложил для разделения нуклеотидов PEI-целлюлозу (полиэтилениминцеллюлозу). Этот анионит выпускают фирмы Serva и Macherey, Nagel. Веймен и Рендерат [399] описали следующую методику приготовления суспензии PEI-целлюлозы из порошка целлюлозы. К 6 мл воды добавляют 3 г 50 %-ного раствора полиэтиленимина (фирма Badische Aniline und Sodafabrik), нейтрализуют раствор концентрированной соляной кислотой, разбавляют его до 15 мл и подвергают диализу в диализной трубке фирмы Visking (10,9 см) в 1 л дистиллированной воды. Диализную воду меняют через 4 и 8 ч. По истечении 20 ч диализа раствор разбавляют до 150 мл, отбирают 90 мл раствора и диспергируют в нем 15 г порошка целлюлозы. Пластинки с таким адсорбентом сушат, элюируют примеси дистиллированной водой и снова сушат. Подвергать раствор полиэтиленимина диализу не обязательно, вместо этого можно элюировать готовые пластинки на 5 см 10 %-ным раствором хлорида натрия и, не

высушивая, довести элюирование дистиллированной водой до верхнего края пластинки. После такой обработки пластинку следует высушить в токе холодного воздуха и еще раз провести элюирование водой [399a].

Ацелированная целлюлоза. Суспензию этого материала готовят, диспергируя 10 г его в 55 мл 95 %-ного спирта, предпочтительно при механическом перемешивании.

Поступающая в продажу ацетилцеллюлоза ацелирована не полностью. Чтобы получить триацетат целлюлозы, Хессе и Хейгель [400] диспергировали 200 г порошка целлюлозы фирмы Schleicher and Schuell (марки 123 или 144) в смеси 4 л бензола, 800 мл уксусной кислоты, 6 мл 60 %-ной хлорной кислоты и 800 мл уксусного ангидрида при 35°C в течение трех дней. Целлюлозу отделяли центрифугированием, диспергировали в метаноле, снова центрифугировали и высушивали при 30°C.

Фосфорилированная целлюлоза. Для приготовления суспензии фосфорилированной целлюлозы MN 300P (фирмы Macherey, Nagel) в 50 мл воды диспергируют 10 г порошка. В работе [401] дана следующая методика приготовления фосфорилированной целлюлозы. 20 г порошка целлюлозы обрабатывают 5 мин 120 мл 3 %-ного раствора полиэтиленимина, после чего разбавляют смесь 200 мл воды, фильтруют через стеклянный фильтр и дважды промывают дистиллированной водой порциями по 120 мл. Полученный продукт перемешивают в течение 5 мин со 120 мл 20 %-ного водного раствора метафосфата натрия, снова фильтруют через стеклянный фильтр и промывают сначала 120 мл 0,25 %-ной соляной кислоты, а затем трижды порциями до 120 мл дистиллированной воды. Влажный продукт диспергируют в 80 мл дистиллированной воды до получения однородной суспензии.

5. НАНЕСЕНИЕ АДСОРБЕНТА НА ПОДЛОЖКУ

Нанесение слоя наливанием суспензии

Обычно этот метод применяется сравнительно редко, хотя приготовить так хроматографические пластинки проще всего. Чтобы получить слои одинаковой толщины, определенные количества суспензии наливают на пластинки заданного размера, помещенные на горизонтальную поверхность. Пластинки покачивают из стороны в сторону, чтобы равномерно распределить суспензию по их поверхности. Некоторые авторы [402] после нанесения суспензии на стеклянные пластинки подвергают их механической вибрации в течение 5 минут, чтобы выровнять слой.

Погружение

Пейфер [4] предложил наносить слой на пластинки, складывая их попарно и окуная в суспензии адсорбента в хлороформе или смеси хлороформа и метанола. (Приготовление суспензии для этой цели описано в разд. 4, посвященном неводным суспензиям.)

Нанесение адсорбента напылением

Этот метод приготовления тонкослойных пластинок первым предложил Рейтсема [95]. Он наносил суспензии на стеклянные пластинки из небольшого краскопульта. Чтобы распылитель мог работать, суспензию необходимо разбавить. Однако таким способом трудно нанести на пластинку равномерный слой. Кроме того, толщина слоя на разных пластинках также может оказаться неодинаковой. Бекерски [403], Морита и Харута [12] и Метше и сотр. [335] наносили суспензии на пластинки из стандартного лабораторного стеклянного пульверизатора. Друдинг [404] для той же цели применил распылитель, которым пользуются дантисты. Бекерски [403] считает, что колебания толщины нанесенного пульверизатором слоя достигают ± 40 мкм. Метше и сотр. [335], однако, утверждают, что эти колебания составляют менее 20 мкм.

Применение направляющих полосок

Существует мнение, что с помощью ручных методов нельзя получить однородные тонкие слои адсорбента, однако оно ошибочно. Если выбрать достаточно ровные стеклянные пластинки и укрепить на их краях стеклянные или металлические полоски, которые толще пластинок на величину, равную желаемой толщине слоя, то можно получить очень однородные слои адсорбента путем выравнивания слоя суспензии шпателем или стеклянным прутком. Этот метод, предложенный Кирхнером и сотр. [2] в 1951 г. (или его модификации), обычно и используется для получения ровных слоев свободного адсорбента. Выравнивать слой адсорбента можно также стеклянным прутком с резиновыми или пластиковыми манжетами по концам, высота которых должна соответствовать высоте слоя. Можно также навить на концы прутка проволоку или липкую ленту [405, 289, 330, 96, 407].

Мистрюков [28] для получения ровных незакрепленных слоев оксида алюминия использовал металлический стержень с утолщениями по концам. Фирма Serva выпускает специальное

приспособление, основанное на том же принципе. Это четырехгранный пластмассовый брусок, снабженный по концам фланцами, которые при движении бруска по пластинке скользят по ее боковым краям и служат направляющими (рис. 33). Благодаря ступенчатой конструкции фланцев брусок опирается только на края пластинки, а между его средней частью и пластинкой остается узкий зазор, заполняемый суспензией адсорбента. Повернув брусок соответствующей стороной, можно наносить слой суспензии толщиной 0,3; 0,5 и 1,0 мм и шириной 100 мм или слои толщиной 0,3 или 1 мм при ширине 50 мм.

Лис и Де-Муриа [408] наклеивали вдоль краев стеклянной пластинки узкие полоски липкой ленты, которые при нанесении

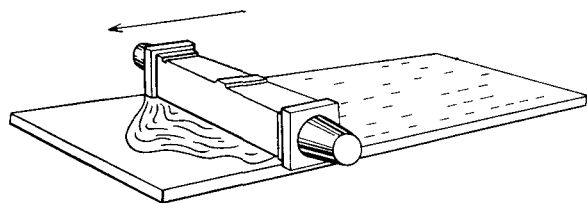


Рис 33 Аппликатор фирмы Serva-Entwicklungslabor Co (с разрешения Gallard-Schlesinger Chemical Mfg Corp)

адсорбента выполняли роль направляющих. Дункан [299] для этой же цели укреплял по краям пластинки два швеллера из нержавеющей стали. Следует упомянуть также работу Гемпа и сотр. [35], которые пользовались рифленным стеклом, и работу Хенсбюри и сотр. [36], которые применяли специальные пластинки с канавками (см разд. 1).

Специальное оборудование

В этом разделе описаны устройства, предназначенные для перемещения пластинок в процессе нанесения суспензии или предусматривающие перемещение аппликатора по ряду пластинок в процессе нанесения адсорбента. Устройство первого типа сконструировано Миллером и Кирхнером [181] в 1954 г для нанесения адсорбента на узкие полоски стекла. Это устройство изображено на рис 34, а на рис. 35 это же устройство показано в разрезе, с тем чтобы наглядно было видно взаимодействие отдельных его частей. В одной из модификаций этого устройства входная рамка прижимается к низу пружиной, а толщина слоя регулируется проволочным адаптером, который скользит по поверхности стеклянной пластинки и реагирует на любое изменение толщины стекла. В этом и других приборах аналогичной конструкции вначале вставляют первую пластинку

и заполняют бункер суспензией, а затем вслед за первой пропускают через прибор серию пластинок и наносят на них ровные слои адсорбента

Основанный на этом принципе прибор сконструирован Мутером и Хофстеттером (фирма Hoffmann-La Roche) и выпуска-

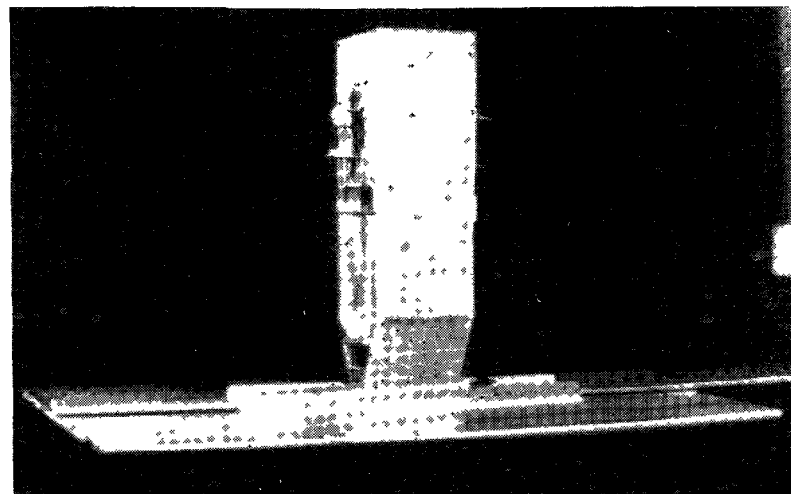


Рис 34 Первое устройство для получения однородных стандартных тонких слоев на стеклянных полосках [181] (с разрешения Am Chem Soc)

ется фирмой SAMAG в Швейцарии. Существуют две модификации этого прибора (рис. 3.6). Одна из них предназначена для нанесения слоев на пластинки размером 100×200 мм, другая более универсальна и пригодна для пластинок шириной как 100, так и 200 мм. Маркуччи и Муссини [409] подробно описали конструкцию устройства для нанесения адсорбента на пластинки, снабженного электроприводом. В этом устройстве стеклянные пластинки протягиваются под резервуаром с суспензией с постоянной скоростью. Фирма SAMAG выпускает автоматические аппликаторы, работающие по этому принципу.

При изготовлении хроматографических пластинок на приборах с ручным приводом, характеристики которых зависят от скорости потока суспензии через щель, толщина полученного слоя может колебаться независимо от того, движется ли прибор по пластинке или пластинка перемещается в приборе. Этот недостаток объясняется тем, что суспензия может продолжать вытекать из щели с одной и той же скоростью при изменении относительной скорости перемещения устройства и

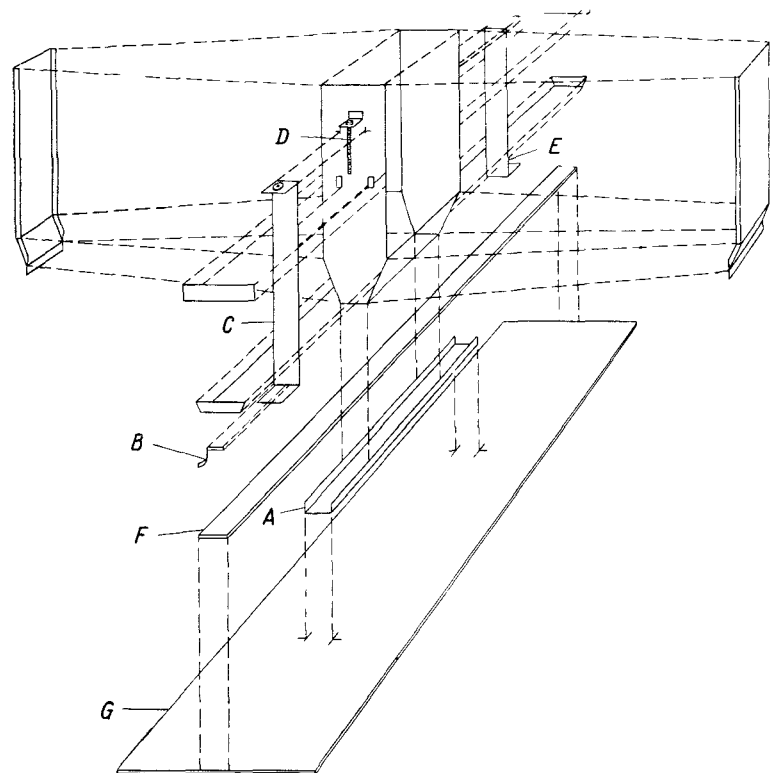


Рис 35. Схема устройства для получения однородных стандартных тонких слоев на стеклянных полосках [181] (с разрешения Am Chem Soc)

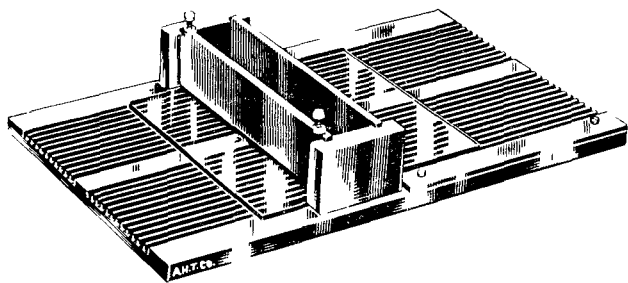


Рис 36. Прибор фирмы SAMAG для приготовления тонкослойных пластинок (с разрешения Arthur H. Thomas Co)

пластинки. (Очевидно, что это не относится к приспособлениям, предназначенным для нанесения суспензии на пластинку, снабженную направляющими полосками.) Ускорение движения может приводить к уменьшению подачи суспензии на поверхность пластинки из-за вязкости суспензии. Толщина слоя может меняться также от одной партии адсорбента к другой из-за небольших изменений состава или других параметров. Чтобы устранить эти трудности, Мойе [410] модифицировал прибор

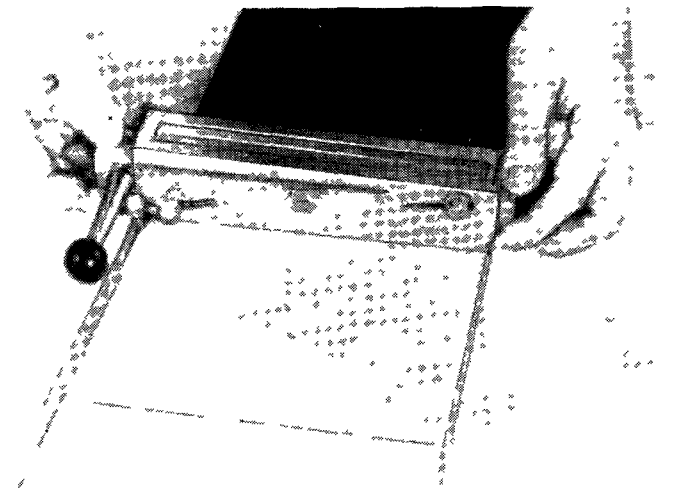


Рис 37. Прибор фирмы Desaga для нанесения слоя адсорбента на стеклянные пластинки (с разрешения Brinkmann Instruments)

Муттера—Хофстеттера, присоединив микрометрический измеритель толщины слоя к каждому концу ножа аппликатора. После высушивания покрытых адсорбентом пластинок нож аппликатора устанавливают таким образом, чтобы он срезал верхнюю часть слоя адсорбента на пластинке при протягивании ее через прибор. На достаточно ровных стеклянных пластинках таким способом можно улучшить поверхность слоя.

Кроме описанных устройств, в которых при нанесении слоя движутся пластинки, имеются приборы, в которых пластинки закрепляются неподвижно, а наносящее слой приспособление движется над их поверхностью. Такая система впервые была предложена Шталем в 1958 г. [204]. Соответствующий прибор выпускает фирма Desaga (ФРГ). Прибор производится в двух модификациях. Одна из них позволяет наносить слой адсорбента постоянной толщины, равной 275 мкм. Вторая позволяет менять толщину наносимого слоя в интервале 0—2000 мкм (рис. 3.7). При работе на этом приборе стеклянные пластинки

укладывают рядом на ровной поверхности, чтобы аппликатор мог двигаться равномерно и непрерывно от начала и до конца. Чтобы пластинки удерживались на подложке, последнюю можно слегка смочить водой, однако следует принять меры, чтобы влага не попала на верхнюю поверхность пластинок, поскольку в этом случае суспензия несколько разбавится и плотность слоя в этом месте уменьшится [411]. Затем на пластинки устанавливают аппликатор, наливают суспензию и приводят приспособление в быстрое равномерное движение. Аналогичные приспособления выпускают фирмы Research Specialities Co. и Kensington Scientific Corp.

Шталь [412] разработал модифицированный вариант аппликатора фирмы Desaga, позволяющий наносить на пластинки слои переменного состава, состоящие из двух различных адсорбентов (например, А и Б). Описанным Шталем способом можно получать пластинки с такими слоями, где содержание адсорбентов (например, А) может меняться от 100% на одном конце пластинки до нуля на противоположном конце. Таким способом удается варьировать как любой из желаемых параметров одного и того же адсорбента (например, рН, содержание буфера и т. п.), так и содержание в смеси двух разных адсорбентов (например, кремневой кислоты и оксида алюминия). Наибольшую ценность этот прибор представляет для поисков оптимального адсорбента для решения конкретной задачи. Принцип разделения, происходящего на пластинках такого типа, поясняет рис. 3.8 (хотя приведенные на рисунке результаты получены не с помощью данного устройства). Описанное приспособление выпускается фирмой Desaga. Уоррен [413] описал более простое устройство для получения градиентных слоев, изготовленное на базе аппликатора фирмы Shandon.

Другую интересную модификацию аппликатора с подвижным бункером разработал Бейдингс [414]. Его прибор снабжен регулируемой входной щелью для изменения толщины наносимого слоя и регулируемыми салазками, что позволяет наносить адсорбент на пластинки разной ширины.

Главная трудность, связанная с использованием таких аппликаторов с подвижным бункером, обусловлена неравномерным перемещением бункера и колебаниями толщины стеклянных пластинок. Фирма Chemetron в Италии и Baird and Tatloch в Англии выпускают приборы такого типа с электрическим приводом, обеспечивающим равномерное перемещение аппликатора.

Фирма Shandon Scientific Co. предложила несколько иной способ нанесения слоев с помощью устройства аналогичного типа. Стеклопластинки помещают на ролики под два на-

правляющих рельса. После заполнения прибора пластинками надувают воздушный мешок, расположенный под роликами, в результате чего пластинки прижимаются к нижней стороне направляющих рельсов. При этом верхние поверхности всех пластинок располагаются на одном и том же уровне, даже если

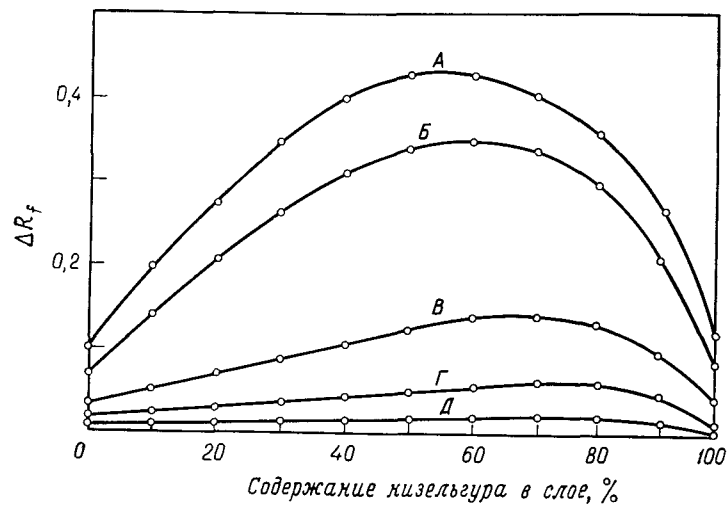


Рис. 3.8. Изменение величин R_f ряда соединений по сравнению с R_f делопона в зависимости от состава слоя. Заимствовано из статьи Abbott D. C., Egan H., Hammond E. W., Tompson J., Analyst, 89, 480 (1964) (с разрешения авторов и The Soc. for Anal. Chem.).

А* 4-(хлор-2-метилфенокси)масляная кислота; Б: 4-(2,3-дихлорфенокси)масляная кислота; В: 4-хлор-2-метилфеноксиуксусная кислота; Г: 2,4-трихлорфеноксиуксусная кислота; Д: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

толщина пластинок несколько различается. На пластинки быстро наносят слой адсорбента с помощью подвижного аппликатора. Детали устройства описанного прибора можно уяснить из рис. 3.9.

Описано много модификаций этих приборов, особенно с подвижным бункером, начиная от простых пластиковых бункеров и кончая более сложными устройствами [416—418]. Уосики [5] использовал прибор такого типа для нанесения тонких слоев адсорбента на предметные стекла. Бергер и сотр. [419] модифицировали это устройство таким образом, чтобы можно было одновременно наносить на пластинку смежные слои двух разных адсорбентов. Эббот и Томсон [420] модифицировали прибор фирмы Desaga с тем, чтобы можно было получать клиновидные слои, а Бекстид и сотр. [421] использовали форму для

получения более толстых клиновидных слоев. Фирма Kontes выпускает снабженные канавками и двумя направляющими бортиками клиновидные пластинки с постепенно убывающей глубиной (от 1000 до 125 мкм).

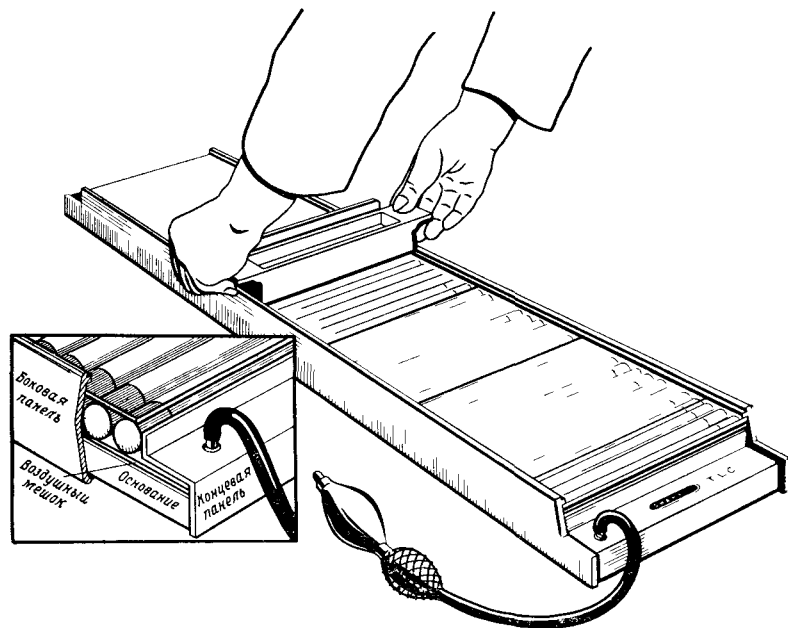


Рис. 39 Выпускаемое фирмой Shandon устройство UNOPLAN для покрытия тонкослойных пластинок (с разрешения Colab Laboratories).

Нанесение сухого адсорбента

Сухой адсорбент для хроматографии на незакрепленном слое можно нанести на подложку любым из описанных выше простых методов с применением направляющих устройств какого-либо типа для регулировки толщины получаемого слоя.

6. СУШКА И АКТИВАЦИЯ СЛОЯ АДсорбЕНТА

Необходимая степень сухости адсорбента зависит, разумеется, от конкретной ситуации, в частности от типа разделяемых соединений или применяемых элюентов. Барбье [422] нашел, что на пластинках с кремневой кислотой, высушенных при 95—105°C в течение часа, *n*-бензохиноны разделяются плохо из-за чересчур сильной адсорбции. Однако, если дать пластин-

кам предварительно постоять на воздухе в течение 48 ч, можно получить хорошее разделение. Другой способ дезактивации пластинок — «многократное элюирование», которое описано ниже

Пластинки, на которые нанесена суспензия, содержащая крахмал, можно помещать в сушильный шкаф сразу же по нанесении слоя. Однако, если связующим служит алебастр, затвердевание которого связано с переходом в гипс в результате реакции кристаллизации, необходимо выждать известное время для завершения этой реакции и лишь после этого можно сушить адсорбент. Обычно достаточно выждать 30 мин. Адсорбент чаще всего сушат при 110°C в течение 0,5—1 ч. Это время считается нормальным для слоев средней толщины (около 250 мкм). Более толстые слои, применяемые в препаративной хроматографии, необходимо сушить более длительное время. Халпаап [19] сушил слои силикагеля толщиной 1,5—2 мм на воздухе до тех пор, пока они не белели, а затем проводил 3-часовую активацию при 120°C. Корзун и сотр. [18], работавшие со слоями адсорбента толщиной 1 мм, оставляли пластинки стоять на воздухе в течение примерно 16 ч, после чего сушили их 2—4 ч при 80°C. При слишком быстром высушивании пластинок наблюдалось образование трещин на поверхности адсорбента (см. также гл. III, разд. 3).

Слой из целлюлозного порошка или модифицированной целлюлозы обычно сушат на воздухе в течение примерно 12 ч при комнатной температуре или при 50°C в течение 40 мин. Разумеется, нет необходимости тщательно высушивать пластинки, предназначенные для распределительной хроматографии.

Пластинки с сефадексом нельзя пересушивать, поскольку в этом случае растворитель движется по слою более медленно и не равномерно [354]. При высушивании на воздухе слой сефадекса утрачивает влажный блеск. Сефадексу следует сушить так, чтобы оставались различимыми зерна геля. Пересушенный гель можно регенерировать, опрыскав его водой и высушив в токе теплого воздуха.

Пластинки, активированные при температуре выше комнатной, следует хранить в эксикаторе или другом закрытом контейнере, чтобы защитить адсорбент от влаги воздуха. Присутствие осушителя способствует поддержанию пластинок в активном состоянии. При работе с флуоресцеинбромным индикатором, предложенным Кирхнером и сотр. [2], нельзя использовать кислый водопоглотитель, поскольку в этом случае пластинки могут адсорбировать кислые пары в количестве, достаточном, чтобы помешать образованию красного эозинового красителя.

Главный недостаток незакрепленных слоев адсорбента — их склонность к образованию трещин. Из-за этого с ними нужно обращаться осторожно, в особенности при опрыскивании обнаруживающими реактивами. Однако в то же время свободный слой оксида алюминия может характеризоваться очень высокой адсорбционной активностью. Этот адсорбент необходимо активировать при температуре порядка 200°C*. Разумеется, ни крахмал, ни алебастр нельзя подвергать воздействию такой высокой температуры, поскольку при этом они потеряют свои связующие свойства.

Урбах [423] сушил пластинки с оксидом алюминия марки G, обработанным нитратом серебра, 20 мин, постепенно повышая температуру от 115 до 135°C. Перед сушкой он выдерживал пластинки некоторое время при комнатной температуре, чтобы дать затвердеть связующему. Вещества, образующие достаточно стабильные комплексы, можно удовлетворительно разделить на пластинках с малой активностью. Однако те соединения, которые дают менее стабильные комплексы, легче разделяются на более сухих пластинках.

7. СПЕЦИАЛЬНАЯ ОБРАБОТКА АДсорбЕНТОВ

Существует ряд способов обработки адсорбентов, предназначенных для специальных целей. Обычно обрабатывают высушенные пластинки перед нанесением проб. Кирхнер и сотр. [126] в 1954 г. показали, что слои кремневой кислоты необходимо промывать перед использованием их для количественного определения бифенила в цитрусовых и продуктах переработки фруктов. С этой целью пластинку промывали 95 %-ным этиловым спиртом и после этого сушили слой адсорбента 4 мин при 85°C в печи с принудительной вентиляцией. Стенли и сотр. [425] сконструировали приспособление для промывки пластинок для ТСХ, вмещающееся в стандартную банку (рис. 3.10). В этом устройстве растворитель из кюветы подается на адсорбент с помощью полоски толстой фильтровальной бумаги и стекает вниз по слою под действием капиллярных сил. Ковач [426] удалял из адсорбента мешающие хлориды путем предварительной промывки его водой, которую подавали на слой таким же образом, как и обнаруживающий растворитель. Блинн [427] применял двукратную промывку адсорбента ацетоном при анализе пестицидов, чтобы удалить примеси, погло-

* Миллиген [424] показал, что оксид алюминия, высушенный при этой температуре, все еще содержит около 87 % влаги, которую можно удалить только при значительно более высоких температурах. При этом активность адсорбента снижается.

щающие в ИК-области. Браун и Бенжамин [428] для удаления мешающих адсорбированных примесей применяли промывку адсорбента смесью метанол—эфир (80:20) в поперечном направлении, т. е. под прямым углом к направлению движения растворителя при собственно хроматографировании. После та-

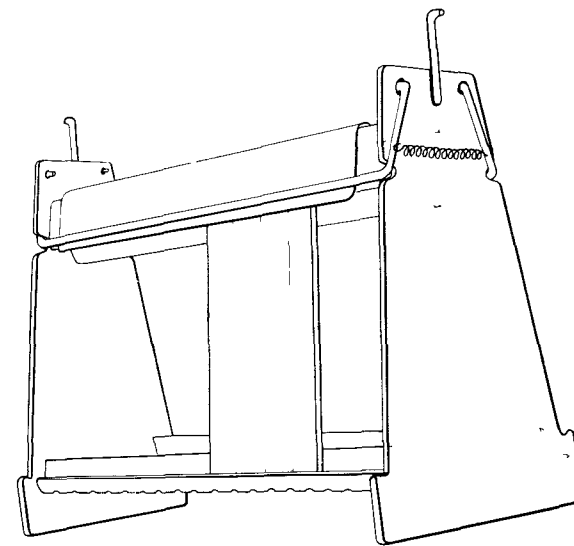


Рис 3.10 Штатив для промывки тонкослойных пластинок размером 15×25×25 см (соответствуют стандартной банке) [425] (с разрешения авторов и Assoc of Offic Anal Chem)

кой обработки пластинки высушивали 25 мин при 110°C. Швейгер [393] обрабатывал пластинки с целлюлозой, предназначенные для разделения уроновых кислот, 0,5 %-ным раствором ЭДТА для удаления катионов.

Содержание влаги в слое адсорбента можно определить по методу Карла Фишера. Этим методом пользовались, в частности, Миллер и Кирхнер [127]. Для проведения такого анализа 0,5 г адсорбента диспергируют в 5 мл формамида в склянке с притертой пробкой, нагревают смесь на электрической плитке до 120°C в течение 1 мин и охлаждают. Добавляют избыточное количество реактива Фишера и проводят обратное титрование непрореагировавшего остатка реактива стандартной водно-спиртовой смесью. Германек и сотр. [429] определяли содержание влаги в незакрепленном слое оксида алюминия, измеряя потерю массы адсорбента при 4-часовом нагревании его при 800—850°C.

Высушенные пластинки можно пропитать жидкой фазой для распределительной хроматографии или для хроматографии с обращенной фазой, если такую же жидкую фазу не вводили в состав суспензии при нанесении слоя. Для этого существует несколько способов. Во-первых, пластинки можно окунуть в раствор требуемой жидкой фазы. Так, слои адсорбента погружают в 5—15%-ные растворы ундекана и тетрадекана в петролейном эфире [27, 403, 431]. Пропитку методом окунания нужно проводить очень медленно и осторожно, чтобы не повредить слой адсорбента. Этот метод введения пропитки в адсорбент использовался также для введения декалина [432], силиконов [433], карбовакса-400 [432], парафинового масла [434, 435], формамида [436], 2-феноксэтанола и 2-метоксиэтанола [434], нитрометана [432], арахисового [437] и касторового масел [438].

Другой метод пропитки адсорбента жидкой фазой состоит в пропитывании пластинки раствором жидкой фазы в восходящем или нисходящем направлении, подобно тому как это делается при хроматографировании. В этом случае вероятность повреждения слоя адсорбента меньше. Таким способом была проведена пропитка адсорбента парафиновым маслом [439], *n*-деканом [440], растительными маслами [411], *N,N*-диметилформамидом [442] и пропиленгликолем [443].

Жидкую фазу можно нанести на пластинку и из пульверизатора, однако получены данные, свидетельствующие, что при этом пропитка менее равномерна, чем при окунании или пропитывании методом элюирования. Поэтому данный метод применяется реже, чем два первых. Тем не менее с его помощью адсорбент пропитывали парафиновым маслом, формамидом и пропиленгликолем [311]. Кроме жидких фаз для распределительной хроматографии на пластинки напыляют также буферные растворы [217] и растворы комплексообразователей [118, 444, 446, 447]. Моррис [218] нашел, что при введении нитрата серебра в суспензию пропитка получается более однородной и результаты более воспроизводимыми, чем при опрыскивании сухой пластинки раствором нитрата серебра.

Ли и сотр. [448] обнаружили, что для пластинок с силикагелем, обработанных окунанием в 5%-ный раствор нитрата серебра в ацетонитриле с последующим высушиванием на воздухе для удаления растворителя, характерно значительно меньшее фоновое потемнение, чем для пластинок, приготовленных обычными методами. Перрон и Ауфрет [449] погружали пластинки со слоем силикагеля в насыщенный (при температуре 30°C) раствор нитрата серебра в безводном метаноле, свободном от альдегидов. Далее пластинки сушили 30 мин при комнатной температуре. Приготовленный таким путем адсор-

бент не портился после пребывания на дневном свете в течение месяца.

Другой способ введения пропитки в адсорбент состоит в обработке слоя адсорбента парами жидкой фазы. Таким образом в адсорбент вводили нитрометан и 5%-ный водный раствор метанола [432]. Беннет и Хефтмен [450] осуществляли распределительную тонкослойную хроматографию следующим образом. Нанеся разделяемую смесь на пластинку с кизельгуром G, они помещали пластинку над стаканом с кипящей водой и держали до полного увлажнения слоя адсорбента. Затем пластинку помещали под колпак и выдерживали до начала высыхания адсорбента на углах пластинки. После этого пластинку переносили в камеру для разделения.

После опыления пластинок пропитывающим реактивом их обычно сушат 15 мин на воздухе, после чего они пригодны к употреблению. Пластины, опрысканные водными растворами комплексообразователей, можно сушить в сушильном шкафу в течение обычного времени. Количество пропитки, введенное в адсорбент, определяют взвешиванием [423, 311].

Одно из преимуществ метода пропитки адсорбента жидкостью после нанесения слоя адсорбента реализуется при двумерной хроматографии. В этом случае пропитку адсорбента проводят по окончании первого проявления хроматограммы. При этом адсорбент можно модифицировать таким образом, что он при втором элюировании приобретет новые адсорбционные характеристики и в результате улучшится разделение. Так, например, Кауфман и сотр. [451] вначале проводили обычное адсорбционное хроматографическое разделение в одном направлении, после этого пропитывали адсорбент на пластинке парафиновым маслом или ундеканом [452] и проводили в перпендикулярном направлении разделение методом распределительной хроматографии с обращенной фазой. Урбах [423] сначала проводил разделение на оксиде алюминия в одном направлении, далее пропитывал адсорбент 2-феноксэтанолом и хроматографировал в перпендикулярном направлении. Бергельсон и сотр. [445] при разделении мононенасыщенных жирных кислот первое элюирование проводили на силикагеле, пропитанном додеканом, затем наносили на пластинку комплексообразователь (нитрат серебра) и элюировали еще раз в поперечном направлении.

Уонг и сотр. [453] ацетилировали полиамид, погружая готовые пластинки с полиамидным слоем на 5 мин в смесь уксусного ангидрида с безводным пиридином (20:7). Пластины сушили в подвешенном состоянии в течение суток при комнатной температуре и 30 мин при 70°C. Для проверки полноты

ацетилирования слой адсорбента опрыскивали раствором нингидрина. Окраска полностью ацетилированного полиамида при этом не менялась.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949).
2. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
3. Hofmann A. F., Anal. Biochem., 3, 145 (1962).
4. Peifer J. J., Mikrochim. Acta, 1962, 529.
5. Wasicky R., Anal. Chem., 34, 1346 (1962).
6. Bancher E., Scherz H., Prey V., Mikrochim. Acta, 1963, 712.
7. Van Deenen L. L. M., de Haas G. H., Biochim. Biophys. Acta, 70, 538 (1963).
8. Dobiasova M., J. Lipid Res., 4, 481 (1963).
9. Hansson J., Explosivstoffe, 10, 73 (1963).
10. Heacock R. A., Mahon M. E., Can. J. Biochem. Physiol., 41, 487 (1963).
11. Hofmann A. F., "Thin-Layer Adsorption Chromatography of Lipids", in Biochemical Problems of Lipids (B. B. A. Library Vol. 1), A. C. Frazer, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 1.
12. Morita K., Haruta F., J. Chromatogr., 12, 412 (1963).
13. Naff M. B., Naff A. S., J. Chem. Educ., 40, 534 (1963).
14. Peifer J. J., Janssen F., Muesing R., Lundberg W. O., J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 292 (1962).
15. Peifer J. J., Muesing R., Janssen F., American Oil Chemists' Society Meeting, Minneapolis, Sept. 30, 1963.
16. Wang K.-T., Lin Y.-T., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), 10, 146 (1963).
17. Wiedenhof N., J. Chromatogr., 15, 100 (1964).
18. Korzun B. P., Dorfman L., Brody S. M., Anal. Chem., 35, 950 (1963).
19. Halpaap H., Chem.-Ing.-Tech., 35, 488 (1963).
20. Rigby F. L., Bethune J. L., Am. Soc. Brewing Chem. Proc., 1955, 174.
21. Allentoff N., Wright G. F., Can. J. Chem., 35, 900 (1957).
22. Barrett C. B., Dallas M. S. J., Padley F. B., J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 580 (1963).
23. Barrett C. B., Dallas M. S. J., Padley F. B., Chem. Ind. (London), 1962, 1050.
24. Bottura G., Breccia A., Marchetti F., Spalletti F., Ric. Sci. Rend. Ser. A, 6, 373 (1964).
25. Breccia A., Spalletti F., Bottura G., Marchetti F., private communication.
26. Kabara J. J., Kabara G. C., Wojtalik R. S., J. Chromatogr., 15, 267 (1964).
27. Kaufmann H. P., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 81 (1962).
28. Mistryukov E. A., Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 2071 (1961).
29. Rybicka S. M., Chem. Ind. (London) 1962, 308.
30. Шевченко З. А., Фаворская И. А., Вестн. Ленингр. Унив., сер. физ. хим., 19, 107 (1964).
31. Wohnlich J. J., Chromatogr. Symp., 2nd, Brussels, 1962, 255.
32. Wohnlich J. J., Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 729 (1964).
33. Wohnlich J. J., J. Pharm. Belg., 19, 53 (1964).
34. Clapp M. P., Jeter J., J. Chromatogr., 17, 578 (1965).
35. Gamp A., Studer P., Linde H., Meyer K., Experientia, 18, 292 (1962).
36. Hansbury E., Ott D. G., Perrings J. D., J. Chem. Educ., 40, 31 (1963).
37. Matherne M. J., Jr., Bathalter W. H., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 1012 (1966).
38. Collins R. F., Chem. Ind. (London), 1969, 614.
39. Boyd G. S., Hutton H. R. B., Biochim. Biophys. Acta, 69, 419 (1963).
40. Weiner L. M., Zak B., Clin. Chim. Acta, 9, 407 (1964).
41. Arreguin B., J. Chromatogr., 26, 527 (1967).
42. Squibb R. L., Nature, 198, 317 (1963).
43. Marsh C. L., Jolliff C. R., Payne L. C., Tech. Bull. Regist. Med. Technol., 34, 1 (1964).
44. Lestienne A., Fr. Pat. 1, 370, 780 (August 28, 1964).
45. Merck E., Darmstadt, Germany.
46. Halpaap H., Bausch H., J. Chromatogr., 48, 144 (1970).
47. Roessler H., Halpaap H., Klatyk K., Ger. Pat. 1, 908, 695 (October 15, 1970).
48. Baur E. W., private communication.
49. Baur E. W., J. Lab. Clin. Med., 61, 166 (1963).
50. Correni E., Naturwissenschaften, 51, 40 (1964).
51. Dangerfield W. G., Nature, 202, 520 (1964).
52. Schweda P., J. Chromatogr., 63, 67 (1971).
53. Synder F., Anal. Chem., 35, 599 (1963).
54. Korzun B. P., Brody S., J. Pharm. Sci., 53, 454 (1964).
55. Rosmus J., Pavlicek M., Deyl Z., "Centrifugal Chromatography, XII. Centrifugal Thin-Layer Chromatography", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettólo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 119.
56. Rabenort B., J. Chromatogr., 17, 594 (1965).
57. Koss F. W., Jerchel D., Naturwissenschaften, 51, 382 (1964).
58. Connors W. M., Boak W. K., J. Chromatogr., 16, 243 (1964).
59. Janák J., J. Chromatogr., 15, 15 (1964).
60. Covelto M., Schettino O., "The Application of Thin-Layer Chromatography to Investigations of Antifermentatives in Foodstuffs", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettólo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 215.
61. Lie K. B., Nyc J. F., J. Chromatogr., 8, 75 (1962).
62. Rimmer J. G., Chromatographia, 1, 219 (1968).
63. Pogacar P., Kleinle B., Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med., 60, 1 (1967); through Chem. Abstr., 67, 78639t (1967).
64. Pogacar P., Kleinle B., Krapp P., Luehrsen K., J. Chromatogr., 29, 287 (1967).
65. Lenk H. P., Gleich W., J. Chromatogr., 43, 350 (1969).
66. Lenk H. P., Gruber H., J. Chromatogr., 43, 355 (1969).
67. Ikaš R., Rapaport E., J. Chem. Educ., 44, 297 (1967).
68. Feltkamp H., Dtsch. Apoth.-Ztg., 102, 1269 (1962).
69. Stupnicki R., Stupnicka E., J. Chromatogr., 21, 150 (1966).
70. Ramos V. B., Chem. Quart., 8, 30 (1967).
71. Sen B. N., Anal. Chim. Acta, 23, 152 (1960).
72. Ibid., 12, 154 (1955).
73. Brendel K., Steele R. S., Davidson E. A., J. Chromatogr., 30, 232 (1967).
74. Shaw P. E., Carter R. E., Berry R. E., J. Chromatogr., 47, 507 (1970).
75. Wren J. J., J. Chromatogr., 4, 173 (1960).
76. Asselineau J., Lederer E., Biochim. Biophys. Acta, 17, 161 (1951).
77. Lovern J. A., Biochem. J., 63, 373 (1956).
78. Lovern J. A., Olley J., Hartree E. F., Mann T., Biochem. J., 67, 630 (1957).
79. Lovern J. A., Olley J., Watson H. A., J. Sci. Food Agric., 10, 327 (1959).
80. Lovern J. A., in Essential Fatty Acids, H. M. Sinclair, Ed., Butterworths, London, 1958, p. 47.
81. Noll H., Bloch H., J. Biol. Chem., 214, 251 (1955).
82. Noll H., Bloch H., Asselineau J., Lederer E., Biochem. Biophys. Acta, 20, 299 (1956).
83. Polonsky J., Ferreol G., Toubiana R., Lederer E., Bull. Soc. Chim. Fr., 1956, 1471.
84. Riley C., Nunn R. F., Biochem. J., 74, 56 (1960).

85. Applewhite T. H., Diamond M. J., Goldblatt L. A., J. Am. Oil Chem. Soc., **38**, 609 (1961).
86. Applewhite T. H., Nelson J. S., Goldblatt L. A., J. Am. Oil Chem. Soc., **45**, 101 (1963).
87. Battaile J., Dunning R. L., Loomis W. D., Biochim. Biophys. Acta, **51**, 538 (1961).
88. Demole E., J. Chromatogr., **1**, 24 (1958).
89. Kuroiwa Y., Hashimoto H., J. Inst. Brewing, **67**, 347 (1961).
90. Hayward L. D., Kitchen R. A., Livingstone D. J., Can. J. Chem., **40**, 434 (1962).
91. Onishi I., Tomita H., Fukuzumi T., Bull. Agric. Chem. Soc. Japan, **20**, 61 (1956).
92. Vogel W. C., Doizaki W. M., Zieve L., J. Lipid Res., **3**, 138 (1962).
93. Doizaki W. M., Zieve L., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **113**, 91 (1963).
94. Avigan J., Goodman D. S., Steinberg D., J. Lipid Res., **4**, 100 (1963).
95. Reitsema R. H., Anal. Chem., **26**, 960 (1954).
96. Adamec O., Matis J., Galvanek M., Lancet, **1962-T**, 81.
97. Shukla R. N., Sharma A. R., Mukherjee P. K., Sinha A., Indian Pat. 113, 944 (August 22, 1970); through Chem. Abstr., **76**, 50498h (1972).
98. Петрова Л. И., Антибиотики, **15**, 395 (1970).
99. Waksmundzki A., Rózylo J., Chem. Anal. (Warsaw), **14**, 1217 (1969).
100. Gaertner K., Griessbach R., Kolloid-Z., **160**, 21 (1958).
101. Tarutani T., J. Chromatogr., **50**, 523 (1970).
102. Girgis B. S., J. Appl. Chem. Biotechnol., **22**, 905 (1972).
- 102a. El Rassi Z., Gonnet C., Rocca J. L., J. Chromatogr., **125**, 179 (1976).
103. Hinz W., Ruttloff H., Taeufel A., Silikat Tech., **13**, 378 (1962).
104. Adamec O., Matis J., Galvanek M., Steroids, **1**, 495 (1963).
105. Pitra J., Chem. Lysty, **56**, 495 (1962).
106. Reichelt J., Pitra J., Czech. Collect. Chem. Commun., **27**, 1709 (1962).
107. Klein P. D., Anal. Chem., **34**, 733 (1962).
108. Stokes R. H., Robinson R. A., Ind. Eng. Chem., **41**, 2013 (1949).
109. Dickey F. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **35**, 227 (1949).
110. Erlenmeyer H., Bartels H., Helv. Chim. Acta, **47**, 46 (1964).
111. Majors R. E., Rogers L. B., Anal. Chem., **41**, 1052 (1969).
112. Ibid., p. 1058.
113. Reed G. H., Rogers L. B., Anal. Chem., **37**, 861 (1965).
114. Bartels H., J. Chromatogr., **30**, 113 (1967).
- 114a. Bartels H., Prijs B., "Specifically Adsorbing Silica Gels" in Advances in Chromatography, Vol. 11, J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, p. 115.
115. Dimov N., God. Nauchnoizsled. Inst. Goriva Toplotekhn. (Sofia), **7**, 137 (1961); through Chem. Abstr., **58**, 8428 (1963).
116. Goering H. L., Closson W. D., Olson A. C., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3507 (1961).
117. De Vries D., Chem. Ind. (London), **1962**, 1049.
118. Morris L. J., Chem. Ind. (London), **1962**, 1238.
119. Gupta A. S., Dev S., J. Chromatogr., **12**, 189 (1963).
120. Markl P., Hetch F., Mikrochim. Acta, **1963**, 970.
- 120a. Tuerler M., Hoegl D., Mitt. Geb. Lebensm.-Hyg., **52**, 123 (1961).
121. Vidrine D. W., Nicholas H. J., J. Chromatogr., **89**, 92 (1974).
122. Yasuda K., J. Chromatogr., **74**, 142 (1972).
- 122a. Gilpin R. K., Sisco W. R., J. Chromatogr., **124**, 257 (1976).
123. Seiler H., Rothweiler W., Helv. Chim. Acta, **44**, 941 (1961).
124. Lipina T. G., Tr. Khim. Khim. Tekhnol., **1962**, 424.
125. Passera C., Pedrotti A., Ferrari G., J. Chromatogr., **14**, 289 (1964).

126. Kirchner J. G., Miller J. M., Rice R. G., J. Agric. Food Chem., **2**, 1031 (1954).
127. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., **24**, 1480 (1952).
128. Struck H., Mikrochim. Acta, **1961**, 634.
129. Bowyer D. E., Leat W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A., Biochem. J., **89**, 24P (1963).
130. Privett O. S., Blank M. L., J. Am. Oil Chem. Soc., **39**, 465 (1962).
131. Summers R. M., Mefferd R. B., Jr., J. Chromatogr., **32**, 587 (1968).
132. Carreau J. P., Lapous D., Raulin J., J. Chromatogr., **42**, 422 (1969).
133. Ma J. C. N., J. Chromatogr., **21**, 151 (1966).
134. Reichstein T., Shoppe C. W., Disc. Faraday Soc., **7**, 305 (1949).
135. Wishcenus H., Kolloid-Z., **100**, 66 (1942).
136. Huneck S., J. Chromatogr., **7**, 561 (1962).
- 136a. Baitsholts A. D., Ardell R. E., J. Chromatogr., **30**, 493 (1967).
137. Halpaap H., Reich W., J. Chromatogr., **33**, 70 (1968).
138. Hofmann A. F., J. Lipid Res., **3**, 391 (1962).
139. Hofmann A. F., Biochim. Biophys. Acta, **60**, 458 (1962).
140. Anacker W. F., Stoy V., Biochem. Z., **330**, 141 (1958).
141. Wolfrom M. L., de Lederkremer R. M., Anderson L. E., Anal. Chem., **35**, 1357 (1963).
142. Schwarz V., Pharmazie, **18**, 122 (1963).
143. Васильева Б., Чесляк И., Антибиотики, **10**, 877 (1965).
144. Grigorescu E., Verbata A., Rev. Med., **13**, 349 (1967); through Chem. Abstr., **68**, 107914g (1968).
145. With K. T., Ugeskr. Laeger, **130**, 641 (1968); through Chem. Abstr., **69**, 33433w (1968).
146. With T. K., J. Chromatogr., **42**, 389 (1969).
147. Pekic B., Acta Pharm. Jugosl., **18**, 141 (1968); through Chem. Abstr., **73**, 48568a (1970).
148. Bomhoff G. H., Tijdschr. Chem. Instrum., **15**, 407 (1968); through Anal. Abstr., **17**, 1853 (1969).
149. Tewari S. N., Ram L., Mikrochim. Acta, **1970**, 58.
150. Matis J., Adamec O., Galvanek M., Nature, **194**, 477 (1962).
151. Kaufmann H. P., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., **64**, 81 (1962).
152. Affonso A., J. Chromatogr., **22**, 452 (1966).
153. Mitchell L. C., J. Chromatogr., **30**, 269 (1967).
154. Dobisi F., Grassini G., J. Chromatogr., **10**, 98 (1963).
155. Hammerschmidt H., Mueller M., Papier, **17**, 448 (1963).
156. Wolfrom M. L., Lederkremer R. M., Schwab G., J. Chromatogr., **22**, 476 (1966).
157. Pataki G., J. Chromatogr., **29**, 126 (1967).
- 157a. Haworth C., Heathcote J. G., J. Chromatogr., **41**, 380 (1969).
158. Wieland T., Lueben G., Determann H., Experientia, **18**, 432 (1962).
159. Badger G. M., Donnelly J. K., Spotswood T. M., J. Chromatogr., **10**, 397 (1963).
160. Spotswood T. M., J. Chromatogr., **3**, 101 (1960).
161. Brady P. R., Hoskinson R. M., J. Chromatogr., **54**, 55 (1971).
162. Ackermann G., Frey H.-P., J. Chromatogr., **33**, 53 (1968).
163. Kasuya H., Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo, **19**, 127 (1968); through Chem. Abstr., **70**, 5360g (1969).
164. Кукушкин И. Н., Карпейская Е. И., Трофимов В. А., Жур. прикл. химии, **44**, 662 (1971).
165. Koenig K.-H., Demel K., J. Chromatogr., **39**, 101 (1969).
166. Hesse G., Engelhardt H., Klotz D., Z. Anal. Chem., **215**, 182 (1965).
167. Kawamura S., Kurotaki K., Kuraku H., Izawa M., J. Chromatogr., **26**, 557 (1967).
168. Fogg A. G., Wood R., J. Chromatogr., **20**, 613 (1965).

- 169 Corbi D, G Med Mil, **114**, 168 (1964), through Chem Abstr, **61**, 10986a (1964)
- 170 Churi R Y, Shenai V A, Parameswaran R, Text Res J, **42**, 628 (1972).
- 171 Alberti G, Giammarì G, Grassini-Strazza G, J Chromatogr, **28**, 118 (1967)
- 172 Alberti G, Massucci M A, Torracca E J Chromatogr, **30**, 579 (1967)
- 173 Koenig K-H, Graf H, J Chromatogr **67**, 200 (1972)
- 174 Torracca E, Costantino U, Massucci M A J Chromatogr, **30**, 584 (1967)
- 175 Kuroda R, Oguma K, Anal Chem, **39**, 1003 (1967)
- 176 Grace W, and Co, Brit Pat 1, 181, 089 (February 11, 1970)
- 177 Smith L L, Foell T, J Chromatogr, **9**, 339 (1962)
- 178 Seiler H, Helv Chim Acta, **44**, 1753 (1962)
- 179 Kirchner J G, Flanagan V P, Gordon Research Conference, Colby Junior College, New London, N H, August, 1962
- 180 Kirchner J G, Flanagan V P, 147th Meeting of the American Chemical Society, Philadelphia, Pa, April, 1964
- 181 Miller J M, Kirchner J G, Anal Chem, **26**, 2002 (1954)
- 182 Obreiter J B, Stowe B B, J Chromatogr, **16**, 226 (1964)
- 183 Onoe K, J Chem Soc Japan, Pure Chem Sect, **73**, 337 (1952)
- 184 Randerath K, Angew Chem, **73**, 436 (1961)
- 185 Huettnerauch R, Klotz L Mueller W, Z Chem, **3**, 193 (1963)
- 186 Segura Cardona R, Sp Pat, 363, 086 (March 1, 1971)
- 187 Page W, Schevey W R, Fr Pat, 1, 581, 874 (September 19 1969)
- 188 Merck E A-G, Fr Pat, 1, 543, 724 (October 25, 1968)
- 189 Copius Peerboom J W, "Separation of Antioxidants on Polyamide Layers", in Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography, K Macek, J M Hais, Eds, Elsevier, Amsterdam, 1965, p 134
- 190 Seybert E K, Link P W, U S Pat, 3, 594, 217 (July 20, 1971)
- 191 Althaus H H, Neuhoef V, Z Physiol Chem, **354**, 1073 (1973)
- 192 Burkofer L, Kaiser C, Meyer-Stoll H A, Suppan F, Z Naturforsch, **17B**, 352 (1962)
- 193 Gauthier H, Mangency G, J Chromatogr, **14**, 209 (1964)
- 194 Maini P, J Chromatogr, **42**, 266 (1969)
- 195 Jelinek M, J Chromatogr, **69**, 402 (1972)
- 196 Okumura T, Kadono T, Ger Pat, 2, 106, 689 (August 19, 1971)
- 197 Okumura T, Kadono T, Nakatani M, J Chromatogr, **74**, 73 (1972).
- 198 Okumura T, Kadono T, J Chromatogr, **86**, 57 (1973)
- 199 Honegger C G, Helv Chim Acta, **45**, 1409 (1962)
- 200 Svennerholm E, Svennerholm L, Biochim Biophys Acta, **70**, 432 (1963)
- 201 Stahl E, "Development and Application of Thin Layer Chromatography", in G B Marini-Bettolo, Ed, Thin-Layer Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 11
- 202 Sease J W, J Am Chem Soc **69**, 2242 (1947)
- 203 Ibid, **70**, 3630 (1948)
- 204 Stahl E, Chem-Ztg, **82**, 323 (1958)
- 205 Brown J L, Johnston J M, J Lipid Res, **3**, 480 (1962)
- 206 Tschesche R, Biernoth G, Wulff G, J Chromatogr, **12**, 342 (1963)
- 207 Stahl E, Arch Pharm, **292/64**, 41 (1959)
- 208 Brochmann H, Groene M, Chem Ber, **91**, 773 (1958)
209. Deters R, Chem-Ztg, **86**, 388 (1962)
- 210 Seher A, Nahrung, **4**, 466 (1960)
- 211 Ronkainen P, J Chromatogr, **11**, 228 (1963)
- 212 Petrowitz H-J, Chem-Ztg, **86**, 815 (1962)
- 213 Teichert K, Mutschler E, Rochelmeyer H, Dtsch Apoth-Ztg, **100**, 477 (1960)
- 214 Skipski V P, Peterson R F, Barclay M, J Lipid Res, **3**, 467 (1962)
- 215 Groeger D, Tyler V E, Dusenberry J E, Lloydia, **24**, 97 (1961)

- 216 Borke M L, Kirch E R, J Am Pharm Assoc Sci Ed, **42**, 627 (1935)
- 217 Honegger C G, Helv Chim Acta, **44**, 173 (1961)
- 218 Morris L J, J Lipid Res, **4**, 357 (1963)
- 219 Prybyłowicz E P, Staudenmayer W J, Perry E S, Batsholts A D, Tischer T N, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittsburgh Pa March 1—5 1965
- 220 Tabak S, Verzola M R M, J Chromatogr, **51**, 334 (1970)
- 221 Tabak S, Mauro A E, De'Acqua A, J Chromatogr, **52**, 500 (1970).
- 222 Halmekoski J, Suom Kemistil, **35B**, 39 (1962)
- 223 Ibid, **36B**, 58 (1963)
- 224 De Simone V, Vicedomoni M, J Chromatogr, **37**, 538 (1968)
- 225 Pifferrì P G, J Chromatogr **43** 530 (1969)
- 226 Yasuda K J Chromatogr, **87**, 565 (1973)
- 227 Yamamoto A, Adachi S, Ishibe Z, Shinji Y, Kaku-Uchi Y, Seki K I, Kitani T, Lipids, **5**, 566 (1970)
- 228 Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A, Lipids, **5**, 494 (1970)
- 229 Baues D A, Jones R A, J Chromatogr, **47**, 130 (1970)
- 230 Yasuda K, J Chromatogr, **60**, 144 (1971)
- 231 Yasuda K, J Chromatogr, **72**, 413 (1972)
- 232 Shapiro D R, Kuwahara S S, Clin Chem, **19**, 1305 (1973)
- 233 Cawthorne M A, J Chromatogr, **25**, 164 (1966)
- 234 Martz M D, Krivis A F, Anal Chem, **43**, 790 (1971)
- 235 Jursik F, Hajek B, Sb Vys Sk Chem-Technol Praise, Anorg Chem Technol, B **14**, 45 (1972), through Chem Abstr, **78**, 168307q (1973)
- 236 Mezzetti T, Lato M, Ruffini S, Cuiffini G, J Chromatogr, **63**, 329 (1971)
- 237 Mezzetti T, Ghebergziabhuier M, Ruffini S, Cuiffini G, Lato M, J Chromatogr, **74**, 273 (1972)
- 238 Warren R J, Zarembo J E, J Pharm Sci, **60**, 307 (1971)
- 239 Turner D L, Silver M J, Baczynski E, Holburn R R, Herb S F, Lud-dy F E, Lipids, **5**, 650 (1970)
- 240 Christie W W, Moore J H, Biochem Biophys Acta, **176**, 445 (1969)
- 241 Powell R G, Kleinman R, Smith C R, Jr Lipids, **4**, 450 (1969)
- 242 Brockerhoff H, J Lipid Res, **8**, 167 (1967)
- 243 Prey V, Berbalk H, Kausz M, Mikrochim Acta, **1962**, 449
- 244 Jeffrey D C, Arditti J, Ermst R, J Chromatogr, **41**, 475 (1969)
- 245 Lato M, Brunelli B, Cuiffini G, Mezzetti T, J Chromatogr, **34**, 26 (1968)
- 246 Ibid, **36**, 191 (1968)
- 247 Shellard E J, Jolliffe G H, J Chromatogr, **40**, 458 (1969)
- 248 Orzalesi G, Messetti T, Rossi C, Bellavita Planta Med, **19**, 30 (1970)
- 249 Morris L J, J Chromatogr, **12**, 321 (1963)
- 250 Kirby E C, J Chromatogr, **80**, 271 (1973)
- 251 Grimmer F, Dedek W, Leibnitz E, Z Naturforsch, **23B**, 10 (1968)
- 252 Koenig H, Z Anal Chem, **251**, 167 (1970)
- 253 Dallas M S J, Nature, **207**, 1388 (1965)
- 254 Kessler H, Mueller E, J Chromatogr, **24**, 469 (1966)
- 255 Berg A, Lam J, J Chromatogr, **16**, 157 (1964)
- 256 Harper D B, Smith H, J Chromatogr, **41**, 138 (1969)
- 257 Upton J D, J Chromatogr, **52**, 171 (1970)
- 258 Hynie S, J Chromatogr, **76**, 270 (1973)
- 259 Karlander S G, Karlsson K A, Leffler H, Samuelsson B E, Steen G O, Biochim Biophys Acta, **270**, 117 (1972)
- 260 Fujino Y, Nakano M, Biochim Biophys Acta, **239**, 273 (1971)
- 261 Morrison W R, Hay J D, Biochim Biophys Acta, **202**, 460 (1970)
- 262 Kanfer J N, Chem Phys Lipids, **5**, 159 (1970)
- 263 Karlsson K, Samuelsson B E, Steen G O, Acta Chem Scand, **22**, 1361 (1968)

264. Karlsson K. A., Chem. Phys. Lipids, 5, 6 (1970).
 265. Rink M., Herrmann S., J. Chromatogr., 12, 415 (1963).
 266. Alvarez Fernandez A., Torre Noceda V., Sanchez Carrera E., J. Pharm. Sci., 58, 443 (1969).
 267. Radecka C., Wilson W. L., J. Chromatogr., 57, 297 (1971).
 268. Nishimoto Y., Tsuchida E., Toyoshima S., Yakugaki Zasshi, 86, 199 (1966); through Chem. Abstr., 64, 18381b (1966).
 269. Wood R., Bever E. L., Snyder F., Lipids, 1, 399 (1966).
 270. Wood R., Piantadosi C., Snyder F., J. Lipid Res., 10, 370 (1969).
 271. Morris L. J., Lab. Pract., 15, 8 (1966).
 272. Dietsche W., Fette, Seifen, Anstrichm., 72, 778 (1970).
 273. Hagen E., Plaste Kautsch., 15, 557 (1968).
 274. Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Forensic. Sci. Soc., 10, 77 (1970).
 275. Dwivedy A. K., Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Chromatogr., 29, 120 (1967).
 276. Harvey R. G., Halonen M., J. Chromatogr., 25, 294 (1966).
 277. Franck-Neumann M., Joessang P., J. Chromatogr., 14, 280 (1964).
 278. Short G. D., Young R., Analyst (London), 94, 259 (1969).
 279. Libíková V., Stuchlík M., Krasnec L., J. Chromatogr., 45, 278 (1969).
 280. Schenk G., Sullivan G. L., Fryer P. A., J. Chromatogr., 89, 49 (1974).
 281. Taylor T., Anal. Biochem., 41, 435 (1971).
 282. Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Forensic Sci., 13, 246 (1968).
 283. Parihar D. B., Prakash O., Bajaj I., Tripathi R. P., Verma K. K., J. Chromatogr., 59, 457 (1971).
 284. Турель Е. О., Кузнецова Е. В., Рудой С. А., Скол С. Л., Жур. анал. хим., 27, 1194 (1972).
 285. Grlc L., J. Chromatogr., 48, 562 (1970).
 286. Bajaj I., Verma K. K., Prakash O., Parihar D. B., J. Chromatogr., 46, 261 (1970).
 287. Brockmann H., Volpers F., Chem. Ber., 80, 77 (1947).
 288. Brockmann H., Volpers F., Naturwissenschaften, 33, 58 (1946).
 289. Černý V., Joska J., Lábler L., Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 1658 (1961).
 290. Matthews J. S., Pereda-V. A. L., Auguilera-P. A., J. Chromatogr., 9, 331 (1962).
 291. Petschik H., Steger E., J. Chromatogr., 9, 307 (1962).
 292. Tschesche R., Komietani K., Kowitz F., Sntzke G., Chem. Ber., 94, 3327 (1961).
 293. Vacíková A., Felt V., Malíková J., J. Chromatogr., 9, 301 (1962).
 294. Groeger D., Erge D., Pharmazie, 18, 346 (1963).
 295. Zinkel D. F., Rowe J. W., J. Chromatogr., 13, 74 (1964).
 296. Urbach G., J. Chromatogr., 12, 196 (1963).
 297. Mueller K. H., Honerlagen H., Arch. Pharm., 293/65, 202 (1960).
 298. Procházka Z., Chem. Listy, 55, 974 (1961).
 299. Duncan G. R., J. Chromatogr., 8, 37 (1962).
 300. Sinclair H. B., Lehrfeld J., Chemist-Analyst, 55, 117 (1966).
 301. Hoerhammer L., Wagner H., Bittner G., Dtsch. Apoth., 14, 148 (1962).
 302. Bhandari P. R., Lerch B., Wohlleben G., Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg, 107, 1618 (1962).
 303. Schwartz D. P., Keeney M., Parks O. W., Microchem. J., 8, 176 (1964).
 304. Schwartz D. P., Parks O. W., Microchem. J., 7, 403 (1963).
 305. Nicolaidis N., J. Chromatogr., 8, 717 (1970).
 306. Snyder L. R., J. Chromatogr., 28, 300 (1967).
 307. Keefer L. K., J. Chromatogr., 31, 390 (1967).
 308. Keefer L. K., Johnson D. E., J. Chromatogr., 69, 215 (1972).
 309. Tore J. P., Anal. Biochem., 7, 123 (1964).

310. Tore J. P., J. Chromatogr., 12, 413 (1963).
 311. Vaedtke J., Gajewska A., J. Chromatogr., 9, 345 (1962).
 312. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 190, 380 (1962).
 313. Prey V., Scherz H., Bancher E., Mikrochim. Acta, 1963, 567.
 314. Badings H. T., Wassink J. G., Neth. Milk Dairy J., 17, 132 (1963).
 315. Hofmann A. F., "Thin-Layer Chromatography of Bile Acids and Their Derivatives", in New Biochemical Separations, A. T. James and L. J. Morris, Eds., Van Nostrand, London, 1964, p. 261.
 316. Badings H. T., J. Am. Oil. Chem. Soc., 36, 648 (1959).
 317. Eisenberg W. C., Gilman R. E., Finley K. T., J. Chromatogr., 44, 569 (1969).
 318. Brodasky T. F., Anal. Chem., 35, 343 (1963).
 319. Hesse G., Alexander M., Journess Intern. Etude Methodes Separation Immediate Chromatogr., Paris 1961, 1962, p. 229.
 320. Procházka Z., J. Chromatogr., 48, 113 (1970).
 321. Rahandhra T., Chromatogr. Symp. 2nd Brussels, 1962, p. 261.
 322. Rahandhra T., Chanez M., Boiteau P., Jaquard S., Ann. Pharm. Fr., 21, 561 (1963).
 323. Brud W. S., J. Chromatogr., 18, 591 (1965).
 324. Kramer J. K. G., Schiller E. O., Gesser H. D., Robinson A. D., Anal. Chem., 36, 2379 (1964).
 325. Wolf F., Kotte G., Hannemann J., Chem. Tech. (Berlin), 23, 550 (1971).
 326. Marino V. S., J. Chromatogr., 46, 125 (1970).
 327. Wang K.-T., J. Chinese Chem. Soc. (Taiwan), 8, 241 (1961).
 328. Egger K., Z. Anal. Chem., 182, 161 (1961).
 329. Daviděk J., Davidková E., Pharmazie, 16, 352 (1961).
 330. Daviděk J., Procházka Z., Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 2947 (1961).
 331. Mottier M., Potterat M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 43, 118 (1952).
 332. Wang K.-T., Huang J. M. K., Wang I. S. Y., J. Chromatogr., 22, 362 (1966).
 333. Toyo Chemical Industry Co., Ltd., Fr. Pat., 2, 112, 775 (July 28, 1972).
 334. Urion E., Metche M., Haluk J.-P., Brauwissenschaft, 16, 211 (1963).
 335. Metche M., Haluk J.-P., Nguyen Q.-H., Urion E., Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, 1080.
 336. Nordby H. E., Kew T. J., Fisher J. F., J. Chromatogr., 24, 257 (1966).
 337. Wagner H., Hoerhammer L., Macek K., J. Chromatogr., 31, 455 (1967).
 338. Roesler H., Heinrich W., Marby T. J., J. Chromatogr., 78, 432 (1973).
 339. Quarmby C., J. Chromatogr., 34, 52 (1968).
 340. Moreno Dalmau J., Pla Delfina J. M., Del Pozo Ojeda A., J. Chromatogr., 48, 118 (1970).
 341. Ibid., 78, 165 (1973).
 341a. Loomis W. D., Battaile J., Photochemistry, 5, 423 (1966).
 342. Cliford M. N., J. Chromatogr., 94, 261 (1974).
 343. Janák J., Chem. Ind. (London), 1967, 1137.
 344. Janák J., Kubecova V., J. Chromatogr., 33, 132 (1968).
 345. Martinu V., Janák J., J. Chromatogr., 65, 477 (1972).
 346. Hamada S., Ingbar S. H., J. Chromatogr., 61, 352 (1971).
 347. Raanen H. P., J. Chromatogr., 44, 522 (1969).
 348. Ibid., 53, 605 (1970).
 349. Ibid., p. 600.
 350. Dohnt J. H., Mulders-Dijkman G. J. C., De Beauveser J. C., Kuijpers G. G., J. Chromatogr., 52, 429 (1970).
 351. Hesse G., Engelhardt H., Kaltwasser R., Chromatographia, 1, 302 (1968).
 352. Epton E., Holden S. R., McLaren J. V., J. Chromatogr., 110, 327 (1975).
 353. Ardelit H. W., Lange P., Z. Chem., 3, 266 (1963).
 354. Determann H., Experimentia, 18, 430 (1962).
 355. Wieland T., Determann H., Experimentia, 18, 431 (1962).

- 356 *Johansson B G, Rymo J*, Acta Chem Scand, **16**, 2067 (1962)
 357 *Dose K, Krause G*, Naturwissenschaften, **49**, 349 (1962)
 358 *Johansson B G, Rymo L*, Acta Chem Scand, **18**, 217 (1964)
 359 *Johansson B G, Rymo L*, Biochem J, **92**, 5P (1964)
 360 *Morris C J O R*, J Chromatogr, **16**, 167 (1964)
 361 *Morris C J O R*, Biochem J, **92**, 6P (1964)
 362 *Fassella P, Guarioso A, Turano C*, "Applications of Thin-Layer Chromatography of Sephadex to the Study of Proteins", in Thin-Layer Chromatography, G B Marini Bettolo, Ed, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 205
 363 *Vendrey R, Courault Y, Vanderplancke A*, Compt Rend, **258**, 6399 (1964)
 364 *Tortolani G, Colosi M E*, J Chromatogr, **70**, 182 (1972)
 365 *Morgan R S, Morgan N H, Gunavan R A*, Anal Biochem, **45**, 668 (1972)
 365a *Slagt C, Sipman W A*, J Chromatogr, **74**, 352 (1972)
 366 *Hashizume T, Sasaki Y*, Agric Biol Chem (Tokyo), **27**, 881 (1963), through Chem Abstr, **60**, 12347 (1964)
 367 *Andrews P*, Biochem J, **91**, 222 (1964)
 368 *Nieschlag E, Otto K*, Z Physiol Chem, **340**, 46 (1965)
 369 *Ackers G K*, Biochem, **3**, 723 (1964)
 370 *Siegel L. M., Monty K J*, Biochim Biophys Res Commun, **19**, 494 (1965)
 371 *Edsall K T*, in The Proteins, Vol 1, Pt B, Neurath H, Bailey K, Eds, Academic Press, New York, 1953, p 634
 372 *Ackers G K, Thompson T E*, Proc Natl Acad Sci U S, **53**, 342 (1965).
 373 *Winzor D J, Scheraga H A*, J Phys Chem, **68**, 338 (1964)
 374 *Mangold H K*, J Am Oil Chem Soc, **38**, 708 (1961)
 375 *Hradec J, Menšík P*, J Chromatogr, **32**, 502 (1968)
 376 *Bhatnagar V M, Liberu A*, J Chromatogr, **18**, 177 (1965)
 377 *Chan A S K, Ellsworth R K, Perkins H J, Snow S E*, J Chromatogr, **47**, 395 (1970)
 378 *Smith L W, Breidenbach R W, Rubenstein D*, Science, **148**, 508 (1965)
 379 *Petrović S M, Petrović S E*, J Chromatogr, **21**, 313 (1966)
 380 *Canic V D, Turic M N, Perisic N U*, Z. Anal Chem, **228**, 258 (1967)
 381 *Berger J A, Meyniel G, Petit J, Blanquet P*, Bull Soc Chim Fr, **1963**, 2662
 382 *Greenland R D, Roth W, Gieske T, Michaelson I A*, Anal Biochem, **62**, 305 (1974)
 383 *Lepri L, Desideri P G, Mascherini R*, J Chromatogr, **70**, 212 (1972).
 384 *Lepri L, Desideri P G, Coas V*, J Chromatogr, **52**, 412 (1970)
 385 *Decker P, Hoeller H*, J Chromatogr, **7**, 392 (1962)
 386 *Brinkman U A T, De Vries G, Leene H R*, J Chromatogr, **69**, 181 (1972)
 387 *Graham R J T, Carr A*, J Chromatogr, **46**, 301 (1970)
 388 *Zabin B A, Rollins C B*, J Chromatogr, **14**, 534 (1964)
 389 *Roessel T*, Z Anal Chem, **197**, 333 (1963)
 390 *Knappe E, Peteri D, Rohdewald I*, Z Anal Chem, **197**, 364 (1963)
 391 *Randerath K*, Nature, **205** (1965)
 392 *Randerath K, Struck H*, J Chromatogr, **6**, 365 (1961)
 393 *Schweiger A*, J Chromatogr, **9**, 374 (1962)
 394 *Мудаева О С, Рыжкова В К*, Мед пром, **17**, 44 (1963)
 394a *Wolfrom M. L., de Lederkremer R M, Schwab G*, J Chromatogr, **22**, 474 (1966)
 395 *Coffey R G, Newburgh R W*, J Chromatogr, **11**, 376 (1963)
 396 *Boernig H, Reinicke C*, Acta Biol Med Ger, **11**, 600 (1963)
 397 *Randerath K*, Nature, **194**, 768 (1962)
 398 *Randerath K*, Angew Chem Int Ed Engl, **1**, 553 (1962)

- 399 *Weimann G, Randerath K*, Experientia, **19**, 49 (1963)
 399a *Randerath K, Randerath E*, J Chromatogr, **22**, 110 (1966)
 400 *Hesse H, Hagel R*, Chromatographia, **6**, 277 (1973)
 401 *Randerath E, Randerath K*, J Chromatogr, **10**, 509, (1963)
 402 *Breccia A, Spalletti F*, Nature, **198**, 756 (1963)
 403 *Bekersky I*, Anal Chem, **35**, 261 (1963)
 404 *Druding L F*, J Chem Educ, **40**, 536 (1963)
 405 *Davidek J, Pokorný J*, Z Lebensm-Untersuch Forsch, **115**, 113 (1961)
 406 *Heřmánek S, Schwarz V, Cekan Z*, Pharmazie, **16**, 566 (1961)
 407 *Dyer T A*, J Chromatogr, **11**, 414 (1963)
 408 *Lees T M, DeMurua P J*, J Chromatogr, **8**, 108 (1962)
 409 *Marcucci F, Mussini E*, J Chromatogr, **11**, 270 (1963)
 410 *Moye C J*, J Chromatogr, **13**, 56 (1964)
 411 *Hara S, Tanaka H, Takeuchi M*, Chem Pharm Bull (Tokyo), **12**, 626 (1964)
 412 *Stahl E*, Angew Chem Int Ed Engl, **3**, 784 (1964)
 413 *Warren B*, J Chromatogr, **20**, 603 (1965)
 414 *Badings H T*, J Chromatogr, **14**, 265 (1964)
 415 *Barbier M, Jaeger H, Tobias H, Wyss E*, Helv Chim Acta, **42**, 2440 (1959)
 416 *Moore W E, Eppland M J*, U S Dep Agric Forest Serv Forest Prod Lab Res Note, **FPL-0119**
 417 *Wood R, Snyder F*, J Chromatogr, **21**, 318 (1966)
 418 *Von Arx E, Neher R*, J Chromatogr, **25**, 109 (1966)
 419 *Berger J A, Meyniel G, Blanquet P, Petit J*, Compt Rend, **257**, 1534 (1963)
 420 *Abbott D C, Thomson J*, Chem Ind (London), **1964**, 481
 421 *Beckstead H D, French W N, Smith S J*, J Chromatogr, **31**, 226 (1967)
 422 *Barbier M*, J Chromatogr, **2**, 649 (1959)
 423 *Urbach G*, J Chromatogr, **12**, 196 (1963)
 424 *Mulligan L H*, J Phys Chem, **26**, 247 (1922)
 425 *Stanley W L, Vannier S H, Gentili B*, J Assoc Off Agric Chem, **40**, 282 (1957)
 426 *Kovacs M F, Jr*, J Assoc Off Agric Chem, **46**, 884 (1963)
 427 *Blinn R C*, J Assoc Off Agric Chem, **46**, 952 (1963)
 428 *Brown T L, Benjamin J*, Anal Chem, **36**, 446 (1964)
 429 *Heřmánek S, Schwarz V, Cekan Z*, Collect Czech Chem Commun, **26**, 3170 (1961)
 430 *Marcuse R, Mobeck-Hanssen U, Goethe P-O*, Fette, Seifen, Anstrichm, **66**, 192 (1964)
 431 *Copius-Peereboom J W, Beekes H W*, J Chromatogr, **9**, 316 (1962)
 432 *Badings H T, Wassink J G*, Neth Milk Dairy, **17**, 132 (1963)
 433 *Furestone D*, J Am Oil Chem Soc, **40**, 247 (1963)
 434 *Cargill D I*, Analyst (London), **87**, 865 (1962)
 435 *Michalec C, Sulc M, Měšťan J*, Nature, **193**, 63 (1962)
 436 *Teichert K, Mutschler E, Rochelmeyer H*, Z Anal Chem, **181**, 325 (1961)
 437 *Jones I D, Butler L S, Gibbs E, White R C*, J Chromatogr, **70**, 87 (1972)
 438 *Ropte D, Gu J U*, Pharmazie, **27**, 544 (1972)
 439 *Anker L, Sonanini D*, Pharm Acta Helv, **37**, 360 (1962)
 440 *Purdy S J, Truter E V*, Analyst (London), **87**, 802 (1962)
 441 *egger K*, Planta, **58**, 664 (1962)
 442 *Korte F, Sieper H*, J Chromatogr, **13**, 90 (1964)
 443 *Kaufmann H P, Sen Gupta A K*, Fette, Seifen, Anstrichm, **65**, 529 (1963)

444. Schreiber K., Aurich O., Osske G., J. Chromatogr., 12, 63 (1963).
 445. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Воронкова В. В., ДАН СССР, 149, № 6, 1319 (1963).
 446. Cornelius J. A., Shone C., Chem. Ind. (London) 1963, 1246.
 447. Morris L. J., J. Chromatogr., 12, 321 (1963).
 448. Lees T. M., Lynch M. J., Mosher F. R., J. Chromatogr., 18, 595 (1965).
 449. Perron R., Auffret M., Oleagineux, 20, 379 (1965).
 450. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 9, 353 (1962).
 451. Kaufmann H. P., Makus Z., Deicke F., Fette, Seifen, Anstrichm., 63, 235 (1961).
 452. Kaufmann H. P., Makus Z., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 1 (1960).
 453. Wang K.-T., Wu P.-H., Shih T.-B., J. Chromatogr., 44, 635 (1969).

НАНЕСЕНИЕ ПРОБЫ

1. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА

В некоторых случаях хроматографическую пластинку перед нанесением пробы необходимо подвергнуть предварительной обработке. Иногда проба слишком разбавлена, и нужно вначале провести концентрирование. Хашми и сотр. [1] описали простую электролитическую ячейку, позволяющую концентрировать ионы металлов непосредственно в капиллярной пипетке для отбора пробы. Цейне и сотр. [2] концентрировали соединения, содержащиеся в биологических жидкостях, в полости акриловой нити. Таким способом удается за 4 мин сконцентрировать 1 мл белкового раствора до объема 0,02 мл с 85 %-ным выходом. Устройства для концентрирования растворов с применением этого метода выпускаются фирмами Biomed Instruments и Bio-Rad Laboratories. Дечейри и сотр. [3] сконструировали прибор для обратимой фильтрации, предназначенной для концентрирования белковых растворов на грубом сефадексе G-25. В этом приборе вода и низкомолекулярные соединения сорбируются, а сконцентрированный раствор центрифугируется через пористую пластинку. Процесс можно повторять неограниченное число раз без извлечения концентрата из прибора. Оуде и Абу-Сеймара [4] разработали метод концентрирования малых проб белков с использованием аквасайда № 2 (натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы фирмы Calbiochem). Навеску этого препарата (10 г) насыпают ровным слоем на стеклянную пластинку размером 10×20 см, заворачивают в целлофан, предварительно смоченный дистиллированной водой, и сушат в течение часа. Далее на целлофан наносят каплю разбавленного раствора. Аквасайд поглощает воду и электролиты сквозь целлофан. При пятикратном концентрировании пробы объемом 200 мкл выход достигал 80 %. Однако при восьмикратном концентрировании выход уменьшался уже до 50 %.

Разумеется, разбавленные растворы можно концентрировать выпариванием. Однако иногда при этом возникают трудности из-за повышения концентрации солей. В этих случаях можно применить обессоливание (см. гл. XVII, разд. 1 и гл. XXIV, разд. 8).

Пестицидные остатки выделяют также вакуумной возгонкой [5].

2. МЕТОДЫ НАНЕСЕНИЯ ПРОБЫ

Прежде чем нанести пробу, намечают точку старта (на расстоянии в 15—20 мм от нижнего края пластинки), а также линию финиша (обычно в 10 см от стартовой точки) [6]. Размечать стартовую линию нужно очень осторожно, стараясь не повредить поверхность адсорбента, поскольку это поведет к искажению формы пятен. При работе с незакрепленным слоем или с адсорбентом с очень малой (5—10 %) добавкой алебаstra это очень трудно, если не невозможно. При более высоком (15—20 %) содержании алебаstra нанести отметки при соблюдении известных предосторожностей уже возможно. Слои адсорбентов с крахмалом в качестве связующего значительно более прочны, и отметки легко наносятся свинцовым карандашом. Легко маркируются также пластинки и гибкие полоски с органическими полимерами в качестве связующих.

При нанесении пробы на хроматографическую пластинку необходимо пользоваться определенными приемами, чтобы добиться оптимального разделения. Пробу наносят в виде раствора в растворителе с минимальной возможной полярностью, поскольку полярные растворители имеют тенденцию к расползанию по адсорбенту и это может повлиять на величину R_f разделяемых компонентов, особенно если хроматографирование ведется менее полярными растворителями [6]. При нанесении пробы в виде раствора в полярном растворителе часто образуются также полосы. Растворитель, в котором растворяют пробу, должен быть относительно летучим, чтобы его можно было легко удалить с пластинки перед началом разделения. Площадь, на которую наносится проба, должна быть как можно меньше, поскольку от этого зависит качество разделения. Обычно, чтобы уменьшить площадь исходного пятна, пробу наносят маленькими порциями несколько раз, каждый раз удаляя растворитель выпариванием. Для ускорения испарения растворителя пластинку перед нанесением пробы можно нагреть или направить на пятно поток воздуха. При препаративном разделении, когда пробу наносят в виде полосы, нужно стремиться к тому, чтобы ее ширина была как можно меньше.

Обычно пробу удобно наносить с помощью калиброванной микропипетки, хотя можно воспользоваться и простыми капиллярными трубками (калиброванные капилляры с объемом в несколько микролитров выпускаются фирмой Drummond Scientific Co.). Нанести пробу можно также с помощью маленькой проволочной петли [7—9]. При проведении количественного анализа удобны микролитровые шприцы или микробюретки с микрометрическим винтом.

В продаже имеются различные специальные трафареты, с помощью которых легко провести стартовую и финишную линии и равномерно расположить пробы вдоль стартовой линии. Обычно какой-либо из трафаретов той или иной фирмы нетрудно приобрести.

На изготовленном из прозрачной пластмассы трафарете фирмы Desaga (рис. 4.1) имеется также ряд кружков, позволяющих оценить площадь пятен различных размеров.

Трафарет фирмы SAMAG изображен на рис. 4.2. Фирма выпускает трафареты двух размеров — для пластинок размером 100 мм и для пластинок размером 200 мм (последний пригоден также одновременно для двух пластинок размером 100 мм). На трафаретах сделан ряд вырезов, в которые вставляют пипетку для нанесения проб.

Уйим [10] и Уйим и Рейби [11] предложили при исследовании биологических объектов методом тонкослойного электрофореза вводить образцы ткани непосредственно в слой адсорбента. Карри и сотр. [12] применили этот метод при тонкослойной хроматографии липидов. Срез ткани они помещали на покровное стекло размером 20×20 мм, которое после этого приклеивали гуммиарабиком к хроматографической пластинке. Пластинку вместе с пробой ткани покрывали слоем силикагеля толщиной 250 мкм. Пробу ткани можно также запрессовать непосредственно в слой адсорбента на готовой хроматографической пластинке [13, 14]. Кулли [15] при анализе цельной крови помещал на слой адсорбента пропитанные кровью и высушенные диски из бумаги.

Разбавленные пробы можно наносить с помощью капилляра, выпаривая растворитель в токе воздуха или инертного газа [16—18].

Кирхнер и сотр. [6] показали, что при слишком большой экспозиции слоя адсорбента на воздухе его активность уменьшается настолько сильно, что меняются величины R_f . Бреннер и сотр. [19] построили график зависимости значений логарифма R_f от логарифма продолжительности экспозиции пластинки на воздухе до начала проявления и нашли, что R_f начинает линейно возрастать уже при двухминутной экспозиции. Чтобы избежать этого, они на время нанесения проб покрывали адсорбент стеклянной пластинкой. Устранить этот эффект и, кроме того, защитить вещества, чувствительные к кислороду, от воздействия последнего можно, поместив пластинку в бокс, выпускаемый фирмой Desaga (рис. 4.3). Бокс снабжен плексигласовой крышкой со скользящим кронштейном, который можно передвигать в поперечном направлении. Пробу вводят с помощью микропипетки сквозь отверстие в кронштейне. Бокс снабжен также штуцером для подачи в него инертного газа.

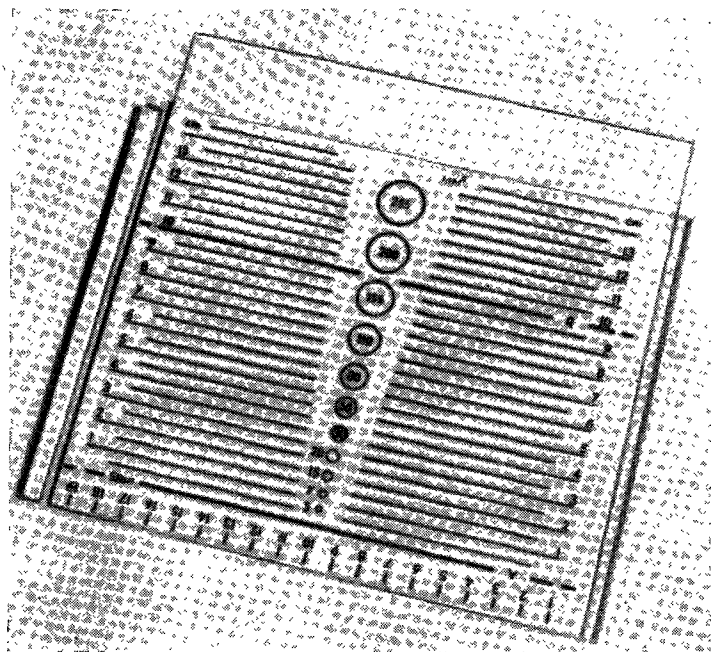


Рис. 4.1. Трафарет фирмы Desaga для нанесения проб (с разрешения Brinkmann Instruments).

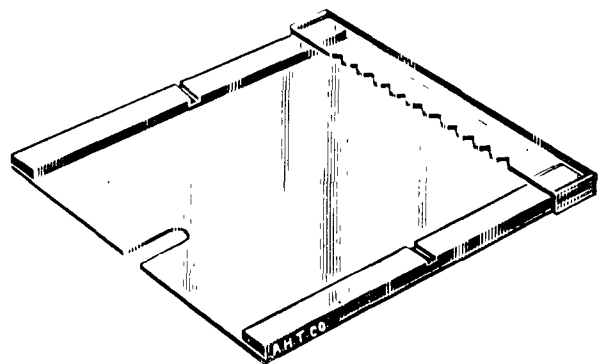


Рис. 4.2. Трафарет фирмы SAMAG (с разрешения Arthur H. Thomas Co.).

Желательно иметь в распоряжении устройство для многократного нанесения на пластинку одного и того же раствора или разных растворов. Это особенно важно, если на пластинку нужно нанести достаточное количество вещества из разбавлен-

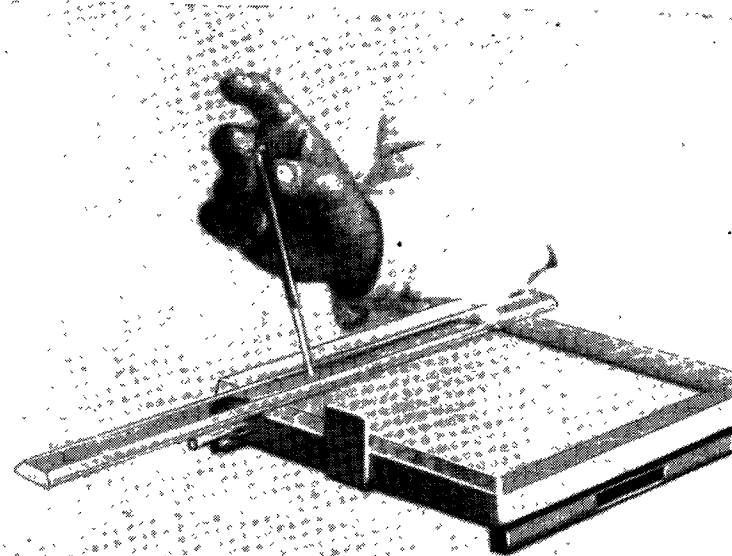


Рис. 4.3. Бокс фирмы Desaga для защиты пластинки от влаги во время нанесения пробы (с разрешения Arthur H. Thomas Co.).

ного раствора. Такие устройства имеются в продаже. В частности, фирма Arthur H. Thomas выпускает прибор конструкции Моргана [20]. В этом приборе пробу помещают в ряд капилляров, установленных в штативе. При нажатии на штатив капилляры одновременно касаются пластинки (рис. 4.4). Похожее приспособление разработано Медведевым и Смоляниновым [21]. В полуавтоматическом аппликаторе [22] помещается 25 шприцев фирмы Hamilton. С его помощью можно одновременно наносить на пластинку несколько разных проб. При многократном нанесении проб растворитель испаряется горячим воздухом. Описаны также и другие автоматические и полуавтоматические устройства для нанесения проб, некоторые из них выпускаются серийно [23—31]. Два из них не только позволяют многократно наносить пробы, но и экстрагировать пробу перед нанесением раствора на пластинку. Сравнительно простой прибор Флинна [32] позволяет в одном опыте экстрагировать 28 порошковых

проб и наносить экстракты на пластинку, что весьма удобно при анализе лекарственных препаратов. Приспособление Фослина и Мьюсила [33, 34] предназначено для экстракции липидов из проб сыворотки.

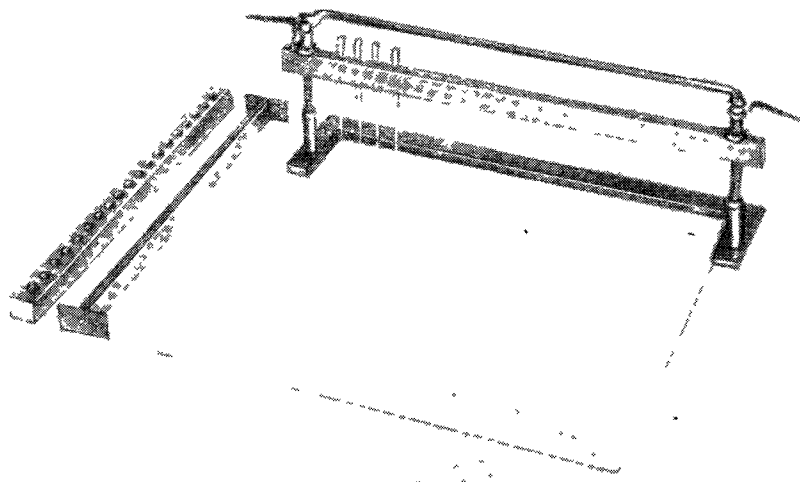


Рис 44 Устройство Томаса—Моргана для одновременного нанесения серии проб. Пробы помещают в капилляры, которые одновременно касаются пластинки при нажиме на планку штатива (с разрешения Arthur H Thomas Co).

Другой метод нанесения проб, особенно удобный для препаративной хроматографии, состоит в том, что пробу наносят не в виде отдельного пятна, а в виде полосы. Этот метод приемлем и при обычных аналитических разделениях, если наносить пробы в виде коротких полосок. Для нанесения таких полосок разработаны многочисленные приспособления, в том числе и достаточно простые, и весьма сложные. В простых устройствах проба либо удерживается капиллярными силами между двумя близко расположенными параллельными пластинками или винтовыми резьбами [35—37], либо вытекает из капилляра или выталкивается из шприца (пластинка при этом перемещается вручную) [38—45], либо проба наносится на пластинку кисточкой при помощи простого направляющего приспособления [46].

Мак-Киббенс и сотр. [47] сконструировали прибор для серийного нанесения проб в бумажной хроматографии, основанный на другом принципе. Позднее этот прибор был использован

и в ТСХ [48, 49]. В этом приборе медицинский шприц укреплен на ползунке, перемещающемся по неподвижному рельсу. Шток поршня шприца упирается в другой рельс, закрепленный под углом к неподвижному. При перемещении ползунка со шприцем по рельсу поршень постепенно вдавливается в цилиндр вследствие уменьшения расстояния между рельсами. Меняя угол

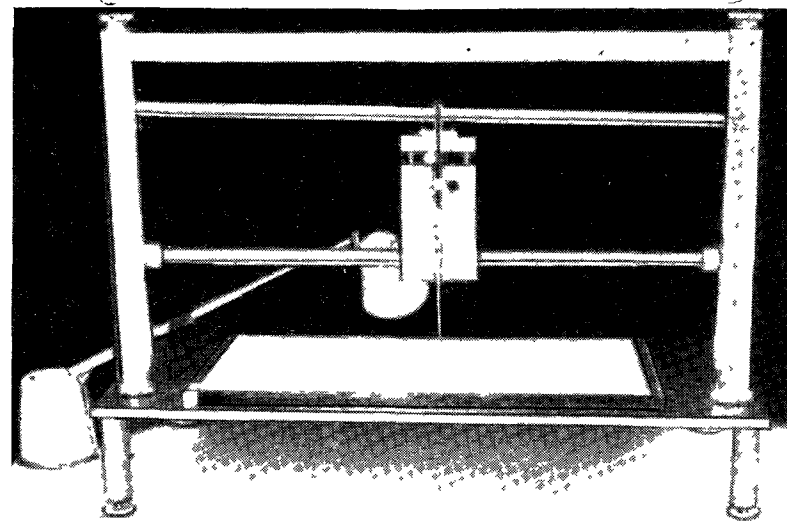


Рис 45. Устройство фирмы Radin-Pelick для нанесения проб на хроматографические пластинки (с разрешения Applied Science Laboratories)

между рельсами, можно регулировать скорость подачи жидкости из шприца. В продаже имеются два типа таких устройств — дозатор типа Radin-Pelick фирмы Applied Science (рис. 4.5) и дозатор, выпускаемый фирмой SAMAG. В приборе Контрактора [50] снабженная накаткой головка шприца с микрометрическим винтом катится по рельсу и при движении ползунка поперек хроматографической пластинки непрерывно подается проба.

Несколько иной способ нанесения пробы в виде равномерной полосы использовали Риттер и Мейер [51]. В разработанном ими устройстве проба подается медицинским шприцем под действием сжатого воздуха или другого газа. Шприц укреплен на пластинке, скользящей по двум параллельным рельсам. Прибор Колемана [52] аналогичен по конструкции, но подача пробы при движении суппорта поперек пластинки включается и выключается автоматически с помощью вентиля, приводящихся в действие сжатым воздухом. Описаны и другие подобные приспособ-

ления [53, 54]. Уэсли и Сендхоф [55] наносили пробы пульверизатором для краски, применяемым художниками, а Лейбеди [56] применил для той же цели шприц с автоматическим приводом. В приборе «Линомат-II» фирмы SAMAG и дозаторе «Аутолайнер» фирмы Desaga проба подается сжатым воздухом, а хроматографическая пластинка при этом перемещается вперед и назад с помощью автоматического привода.

Трутер [57], Феслер и Гелли [58] и Масгрейв [59] наносили пробу на стратовую линию в виде очень узкой полосы. Применяемые этими авторами методы в принципе аналогичны, но несколько различаются по способу нанесения пробы. Феслер и Гелли наносили пробу непрерывной полоской на стартовый край пластинки. После испарения растворителя пластинку погружали в другой растворитель, при использовании которого в качестве элюента значения R_f для всех компонентов разделяемой смеси были близки к единице. Как только растворитель поднимался по слою адсорбента выше зоны нанесения пробы, элюирование прекращали и быстро высушивали пластинку горячим воздухом. Элюирование повторяли, чтобы была уверенность в том, что проба не осталась в месте ее нанесения. Растворитель снова выпаривали, после чего получали хроматограмму обычными методами. Этот метод позволяет сконцентрировать пробу в узкую стартовую полосу.

Трутер использовал специальную крышку с прорезью, через которую хроматографическую пластинку вставляли сверху в камеру для разделения. Достигнув щели, растворитель испарялся, а растворенные вещества концентрировались в виде узкой полосы. В процессе работы пробу наносили на пластинку в виде поперечной полосы и помещали этот край пластинки в растворитель, который перемещал всю пробу в верхнюю часть пластинки и здесь испарялся. Применение гидроксилсодержащих растворителей в чистом виде не давало удовлетворительных результатов, поскольку они испарялись слишком медленно и полоса пробы возле прорези получалась неровной. Если же растворителем служил метанол или подобное ему соединение, адсорбент приходилось снова активировать путем нагревания. Получив узкую полосу пробы на верхнем краю, пластинку переворачивали и хроматографировали в противоположном направлении подходящим растворителем.

Масгрейв проводил разделение на пластинках с составным слоем, включающим узкую (4,5 см) полосу смеси кизельгура, обработанного 18 %-ной соляной кислотой для удаления железа, с сульфатом кальция в качестве связующего. Остальная часть пластинки была покрыта силикагелем с добавкой сульфата кальция. Проба, нанесенная на слой кизельгура, при элюировании формировалась в узкую полосу в момент достижения ею

слоя силикагеля. Пластинки такого типа выпускает фирма Kontes.

В работе Кирхнера и сотр. [1] указывается, что параллельно с исследуемой пробой (пробами) желательно хроматографировать также контрольную пробу: «На каждую серию из пяти хроматограмм (индивидуальных проб) проводили хроматографирование гексаном одной контрольной пробы лимонена с тем, чтобы можно было убедиться, что пластинки хорошо высушены, и чтобы сравнить полученные значения R_f ». Шталь [60] применял метод Брокмена и Шоддера [61], которые предложили проверять активность адсорбентов с помощью красителей. Он пользовался смесью трех красителей: масляного желтого, индофенола и судана III.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hashmi M. H., Shahid M. A., Chughtai F. R., *Mikrochim. Acta*, **1968**, 309.
2. Zeihen R. A., Fiorella B. J., Nijm E. P., Dunea G., *Anal. Chem.*, **46**, 477 (1974).
3. Dechary J. M., Mason A. C. F., Carney W. B., *Anal. Biochem.*, **30**, 142 (1969).
4. Awdeh Z. L., Abu-Samra S., *Anal. Biochem.*, **62**, 601 (1974).
5. Farrow R. P., Elkins E. R., Jr., Beacham L. M., *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **48**, 738 (1965).
6. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
7. Leudy-Tenger F., *Pharm. Acta Helv.*, **37**, 770 (1962).
8. Tate M. E., Bishop C. T., *Can. J. Biochem.*, **41**, 1801 (1963).
9. Samuels S., Fisher C., *J. Chromatogr.*, **71**, 291 (1972).
10. Wieme R. J., *Behringwerk-Mitt.*, **34**, 27 (1958).
11. Wieme R. J., Rabaey M., *Naturwissenschaften*, **44**, 112 (1957).
12. Curri S. B., Levanon Y., *Rev. Roum. Biochim.*, **3**, 159 (1966); through *Chem. Abstr.*, **65**, 19106f (1966).
13. Cheryil G. D., Scaria K. S., *J. Lipid Res.*, **11**, 378 (1970).
14. Kuennert B., Krug H., *Acta Histochem.*, **37**, 194 (1970).
15. Culley W. J., *Clin. Chem.*, **15**, 902 (1969).
16. Munson A. K., Mueller J. R., Yannone M. E., *Microchem. J.*, **15**, 95 (1970).
17. Crabtree A. N., *Lab. Pract.*, **15**, 311 (1966).
18. Beroza M., Getz M. E., Collier C. W., *Environ. Contam. Toxicol.*, **3**, 18 (1968).
19. Brenner M., Niederwieser A., Pataki G., *Experientia*, **17**, 145 (1961).
20. Morgan M. E., *J. Chromatogr.*, **9**, 379 (1962).
21. Медведев В. И., Смоляников В. В., *ЖФХ*, **45**, 1855 (1971).
22. Shapcott D., Lemieux B., Sahapoglu A., *J. Chromatogr.*, **70**, 174 (1972).
23. Bark L. S., Graham R. J. T., McCormick D., *Talanta*, **12**, 122 (1965).
24. Meadows G. C., Graham R. J. T., *Int. Symp. Chromatogr. Electrophor. Lect. Pap.*, 6th GTO, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 94.
25. Boag J. W., Bond P. S., Fielden E. M., Hoedt H., Tramer-Zarebska Z., *J. Chromatogr.*, **73**, 265 (1972).
26. Samuels S., *J. Chromatogr.*, **32**, 751 (1968).
27. Bernhardt C., *Z. Med. Labortech.*, **11**, 212 (1970).
28. Васковская Л. Ф., В сб.: Гигиена применения полимерных материалов и изделий из них. Вып. 1. Киев, 1969, стр. 474.

29. Curtis P. J., Chem. Ind. (London), 1966, 247.
30. De Zeeuw R. A., Dull G. G., J. Chromatogr., 110, 279 (1975).
31. Журбин Г. И., Кокунин В. А., Яценко В. И., Лаб. дело, 1968, 440.
32. Flinn P. E., J. Chromatogr., 82, 117 (1973).
33. Musil F., Fosslien E., J. Chromatogr., 47, 116 (1970).
34. Fosslien E., J. Chromatogr., 63, 59 (1971).
35. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 12, 245 (1963).
36. Klein F. K., Rapoport H., J. Chromatogr., 47, 505 (1970).
37. Turner C. R., J. Chromatogr., 22, 471 (1966).
38. Curtis P. J., Chem. Ind. (London), 1966, 1680.
39. Altman L. J., Trudell J. R., J. Chem. Educ., 47, 404 (1970).
40. Monteiro H. J., J. Chromatogr., 18, 594 (1965).
41. Abraham K. O., Sasry L. V. L., Lab. Pract., 19, 1038 (1970).
42. Darocha T., Gray C. H., Quincey R. V., J. Chromatogr., 27, 497 (1967).
43. Shimi I. R., Imam G. M., Analyst (London), 94, 62 (1969).
44. Vandenheuvel F. A., J. Chromatogr., 25, 102 (1966).
45. Arsenault G. P., J. Chromatogr., 21, 155 (1966).
46. Tamura Z., J. Chromatogr., 19, 431 (1965).
47. McKibbens S. W., Harris J. F., Saeman J. F., J. Chromatogr., 5, 207 (1961).
48. Millett M. A., Moore W. E., Saeman J. F., Anal. Chem., 36, 491 (1964).
49. Von Arx E., Neher R., J. Chromatogr., 25, 109 (1966).
50. Contractor S. F., J. Chromatogr., 20, 182 (1965).
51. Ritter F. J., Meyer G. M., Nature, 193, 941 (1962).
52. Coleman M. H., Lab. Pract., 13, 1200 (1964).
53. Tuba Z., Soti F., Dombi S., Magyar J., Hung. Pat. 7651 (January 28, 1974).
54. Kasang G., Rembold H., J. Chromatogr., 71, 101 (1972).
55. Waessle W., Sandhoff K., J. Chromatogr., 34, 357 (1968).
56. Labadie R. P., Pharm. Weekbl., 107, 421 (1972).
57. Truter E. V., J. Chromatogr., 14, 57 (1964).
58. Fessler J. H., Galley H., Nature, 201, 1056 (1964).
59. Musgrave A., J. Chromatogr., 41, 470 (1969).
60. Stahl E., Schroeter G., Kraft G., Renz R., Pharmazie, 11, 633 (1956).
61. Brockmann H., Schodder H., Ber. 74, 73 (1941).

Глава V

ПОЛУЧЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ

1. ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ-ЭЛЮЕНТА

При выборе адсорбента и растворителя для решения конкретной задачи методом ТСХ экспериментатор может исходить из своего предыдущего опыта в колоночной и бумажной хроматографии и их модификациях, например распределительной хроматографии. В качестве примера можно привести использование так называемого элюотропного ряда растворителей, найденного на основе опыта колоночной хроматографии. Это — ряд (табл. 5.1) растворителей, расположенных в порядке увеличения эффективности вытеснения ими адсорбированных соединений с данного адсорбента. Наиболее известен ряд Траппе [1]; время от времени публикуются варианты этого ряда. Такими рядами можно руководствоваться при подборе растворителя или смеси растворителей для хроматографирования. В действительности эти ряды несколько меняются в зависимости от типа адсорбента и разделяемых соединений. Кауфман и Мейкус [4] приводят следующий ряд растворителей (перечислены в порядке увеличения элюирующей способности) для разделения липидов: ксилол, толуол, бензол, трихлорэтилен, дихлорэтилен, метилхлорид, хлороформ, изоамиловый эфир, изопропиловый эфир, диэтиловый эфир, ацетон и диоксан.

Буленков [5] хроматографировал ряд красителей на свободных слоях оксида алюминия и выявленные им элюотропные ряды растворителей (табл. 5.2) подразделил на три группы. В каждую группу входят растворители с аналогичными элюиционными свойствами. Как для полярных, так и для неполярных растворителей определены коэффициенты активности и на основе полученных данных проведено разделение растворителей на три группы. Первая группа, в которую входят неполярные растворители, вовсе не элюирует или очень слабо элюирует вещества, величины R_f которых меньше 0,3 в растворителях, входящих в состав двух других групп. Вторая группа растворителей проявляет одинаковую элюирующую способность по отношению к полярным и неполярным соединениям; различие коэффициентов активности для этих двух групп соединений не превышает 0,43 (малоновый эфир). В третьей группе растворителей коэффициенты активности у полярных соединений больше, чем

Таблица 5 1

Некоторые элюотропные ряды растворителей

Траппе [1]	Рен [2]	Страйн [3]
Легкий бензин	Лигроин	Легкий бензин, 30—50°C
Циклогексан	Циклогексан	Легкий бензин, 50—70°C
Четыреххлористый углерод	Четыреххлористый углерод	Легкий бензин, 70—100°C
Трихлорэтилен	Трихлорэтилен	Четыреххлористый углерод
Толуол	Хлороформ	Циклогексан
Бензол	1,1,2,2-Тетрахлорэтан	Сероуглерод
Дихлорметан	1,2-Дихлорэтан	Безводный эфир
Хлороформ	Толуол	Безводный ацетон
Эфир	Бензол	Бензол
Этилацетат	Дихлорметан	Толуол
Ацетон	Эфир	Эфиры органических кислот
<i>n</i> -Пропанол	Этилацетат	1,2-Дихлорэтан
Этанол	Метилацетат	Спирты
Метанол	Ацетон	Вода
	Пропанол-1	Пиридин
	Этанол	Органические кислоты
	Метанол	Смеси кислот или оснований, вода, спирты или пиридин

у неполярных. Иначе говоря, скорость движения хроматографической зоны для полярных соединений больше, чем для неполярных.

К элюотропным рядам следует добавить перфторкеросин (Columbia Chemicals Co.), смесь перфторалканов (т. кип. 70—80°C) и перфтор-*n*-гексан (Peninsular Chem. Research), которые нужно поместить во главе неполярных растворителей, так как Эттеуей и сотр. [6, 7] показали, что фторзамещенные углеводороды по своей элюирующей способности менее полярны, чем углеводороды.

Тонкослойная хроматография сама по себе является прекрасным методом для выбора нужного растворителя. Измайлов и Шрайбер [8] и Кроув [9] первыми применили этот метод для подбора растворителей для колоночной хроматографии. Они наносили исследуемые пробы на незакрепленный слой адсорбента

Таблица 5 2

Элюотропные ряды и коэффициенты активности растворителей [5]

Растворитель	R_f испытуемого соединения			Коэффициент активности испытуемого соединения	
	неполярного	полярного	ΔR_f	неполярного	полярного
Первая группа					
1 Петролейный эфир	0,038			0,05	
2 <i>n</i> -Гептан	0,040			0,05	
3 <i>n</i> -Гексан	0,042			0,05	
4 <i>n</i> -Ундекан	0,050			0,06	
5 Декалин	0,052			0,07	
6 Сероуглерод	0,155			0,19	
7 Четыреххлористый углерод	0,246			0,31	
Вторая группа					
8 Ксилол	0,561			0,70	0,68
9 Хлорбензол	0,615			0,77	0,74
10 Толуол	0,616			0,77	0,80
11. Бензол	0,717			0,90	0,95
12 Хлороформ	0,798	0,000	0,798	1,00	1,00
13 Бромистый этил	0,778	0,010	0,768	0,97	1,01
14 Трихлорэтан	0,790	0,015	0,775	0,99	1,02
15 Дихлорэтан	0,810	0,040	0,770	1,01	1,05
16. Анизол	0,984	0,040	0,944	1,23	1,04
17 Диэтиловый эфир	0,973	0,160	0,813	1,22	1,20
18 Метилэтилкетон	0,878	0,218	0,660	1,10	1,33
19 Малоновый эфир	1,000	0,405	0,595	1,25	1,68.

Продолжение табл. 5.2

Растворитель	R_f испытуемого соединения			Коэффициент активности испытуемого соединения	
	неполяр-ного	полярного	ΔR_f	неполяр-ного	полярного
Третья группа					
20. Диоксан	0,882	0,610	0,272	1,11	3,24
21. Изоамиловый спирт	0,990	0,645	0,345	1,24	2,87
22. <i>n</i> -Амиловый спирт	0,980	0,650	0,330	1,23	2,97
23. Этилацетат	0,855	0,555	0,300	1,07	2,85
24. <i>n</i> -Бутанол	0,950	0,690	0,260	1,19	3,65
25. <i>n</i> -Пропанол	0,880	0,680	0,200	1,10	4,40
26. Изопропанол	0,850	0,685	0,165	1,07	5,15
27. Этилацетоацетат	0,000	0,820	0,180	1,25	5,56
28. Ацетон	0,846	0,696	0,150	1,06	5,64
29. Абсолютный этанол	0,840	0,718	0,122	1,05	6,89
30. Диметилформамид	0,000	0,880	1,120	1,25	8,33
31. Метанол	0,870	0,785	0,085	1,09	10,02
32. Вода	0,930	0,880	0,050	1,16	18,60

и, нанося затем с помощью капилляра растворитель, наблюдали распространение пятна по слою в радиальных направлениях. Испытав разные растворители, эти авторы определяли, какой из растворителей позволяет получить лучшее разделение. Миллер и Кирхнер [10] проводили такое разделение на слоях адсорбентов с добавкой связующего. Они брали узкие хроматографические пластинки или полоски, наносили исследуемую смесь, помещали пластинку в пробирку с испытуемым растворителем, элюировали хроматограмму обычным методом, выпаривали избыток растворителя и опрыскивали пластинку обнаруживающим реактивом, чтобы выявить пятна разделенных компонентов. Если индивидуальный растворитель не давал удовлетворительного разделения, пробы элюировали смесью растворителей, один из которых не давал смещения компонентов, а второй перемещал все компоненты. Это, разумеется, лишь грубая схема, поскольку общих для всех соединений правил, обеспечивающих

быстрый выбор растворителя, не существует. В качестве примера Найт и Греннинг [11] называют краситель Luxol Fast Red B, который не движется по слою силикагеля ни вместе с ацетоном, ни вместе с водой, хотя растворим в обоих этих растворителях. В то же время он перемещается по силикагелю их смесью.

Мессарт и Де Клерк [12—136] применили математический анализ для выбора оптимальной системы растворителей в тех случаях, когда это нельзя сделать путем простого сопоставления результатов испытания большого числа хроматографических систем. Моффет и сотр. [13в—13г] описали аналогичный подход к подбору системы растворителей для разделения и идентификации больших групп красителей. Турина и сотр. [14] показали, что математический анализ приемлем для корректировки состава элюента с целью оптимизации разделения.

Бейкер и сотр. [15] применили метод математического планирования эксперимента для изучения пригодности разных систем для достижения хроматографического разделения. Они показали, что исследование такого типа может привести к одному из трех результатов: 1) удастся найти условия успешного разделения; 2) можно получить указания, как следует изменить условия опыта, чтобы улучшить разделение, или 3) исследованные переменные могут оказаться незначимыми, и в этом случае следует искать новый подход к решению проблемы. Работая с органическими сульфонатами, Бейкер и сотрудники нашли, что при растворении исследуемой смеси в растворителе типа метанола или *N,N*-диметилформамида с последующим постепенным добавлением хлороформа (в котором сульфонаты нерастворимы) до начала образования осадка получается система растворителей, обеспечивающая разделение, близкое к оптимальному.

Панова и сотр. [16] описали способ нахождения оптимальных условий хроматографического разделения трехкомпонентной системы с помощью критерия оптимизации с применением симплексного метода планирования эксперимента.

Роузер [16а] рассмотрел классификацию растворителей на основании их склонности к образованию водородных связей и наличия кислотных или основных групп и привел примеры действия растворителей разных типов. Он разделил растворители на шесть классов: 1) не образующие водородных связей (углеводороды); 2) растворители, функционирующие при образовании водородных связей как в качестве доноров, так и в качестве акцепторов протонов (вода, спирты, амины, карбоновые кислоты, амиды и пр.); 3) растворители, играющие при образовании водородной связи роль только доноров протонов (хлороформ); 4) растворители, участвующие в водородной связи только как акцепторы протонов (альдегиды, кетоны, простые и сложные эфиры, нитросоединения и пр.); 5) кислоты (доноры — перенос-

чики иона водорода); 6) основания (акцепторы — переносчики иона водорода).

Лофтс и сотр. [17] систематически изучили состав элюентов, позволяющих разделить аминокислоты на слоях целлюлозы. Эти авторы пришли к выводу, что существует шесть факторов, влияющих на разделение аминокислот под действием сложных смесей растворителей, причем вклад каждого из компонентов смеси может выражаться более чем в одном факторе. К числу этих шести факторов относят в пределе следующие, которые одновременно используют для обозначения идеальных растворителей, обладающих только этой функцией:

1. Ускорители: обычно эти растворители в чистом виде обладают слишком высокой элюирующей способностью.

2. Замедлители: растворители со слишком малой элюирующей способностью.

3. Гомогенизаторы: растворители, которые добавляют в том случае, если ускоритель и замедлитель не смешиваются между собой.

4. Регуляторы pH: вследствие существования как кислых, так и основных аминокислот для их разделения требуются и кислые, и основные растворители, что и обуславливает необходимость применения двумерной хроматографии.

5. Антиразмыватели: поскольку кислотные и основные системы растворителей позволяют получить более четкие пятна, эти системы можно назвать антиразмывателями.

6. Разжижители: если время получения хроматограммы слишком велико, в смесь можно добавить компонент, уменьшающий вязкость и увеличивающий тем самым скорость потока.

Рассмотрев результаты предварительных опытов, Лофтс и сотрудники установили зависимость элюирующей способности различных растворителей от содержания гидроксила и нашли, что оптимальная мольная доля гидроксила (M) лежит в интервале 0,45—0,7. Исходя из этого, авторы [17] предложили для первого проявления двумерной хроматограммы смесь циклогексанол—ацетон—диэтиламин—вода (10:5:2:5), а для второго проявления — смесь трет-бутанол—уксусная кислота—вода (5:1:1). Согласно этим авторам, компоненты первой смеси играют следующие роли:

1. Ускоритель: вода и в меньшей степени циклогексанол.

2. Замедлитель: циклогексанол и в меньшей степени ацетон и диэтиламин.

3. Гомогенизатор: ацетон и в меньшей степени диэтиламин.

4. Регулятор pH: диэтиламин.

5. Антиразмыватель: диэтиламин.

6. Разжижитель: ацетон.

Очик и Розило [18] в теоретическом аспекте рассмотрели зависимость между величинами R_f и составом двухкомпонентной смеси растворителей и применение этой зависимости для расчета условий оптимального разделения. Снайдер исследовал теоретически роль различных растворителей при хроматографическом разделении веществ на оксиде алюминия [19] и кремневой кислоте [20].

Тома [21] и Тома и Перишо [22] изучили теоретические аспекты разделения методом распределительной хроматографии и пришли к выводу, что максимальное разделение двух сходных соединений достигается в том случае, если зоны перемещаются на одну четвертую длины пластинки. На основании этого они рекомендовали такую смесь растворителей, которая позволяет получить среднее значение R_f порядка 0,25. Если желательно изменить состав смеси растворителей, авторы рекомендуют выбрать такой компонент, который селективно меняет структуру одного из хроматографических соединений. Например, можно добавить комплексообразователь. Иногда вместо того, чтобы искать лучшую систему растворителей, целесообразнее провести многократное элюирование или непрерывное хроматографирование, с тем чтобы увеличить длину разделяющего слоя и тем самым улучшить разделение. Тома [23] рекомендует мелкодисперсные адсорбенты, пробы минимальных размеров и элюирование растворителями, обеспечивающими быстрое перемещение разделяемых соединений.

Оптимальные условия разделения с трехкомпонентными системами растворителей найти еще труднее, чем с двухкомпонентными. Ваксмундски и Розило [24] и Розило [25] для интерпретации результатов экспериментов и выбора трехкомпонентной подвижной фазы применили треугольник Гиббса. Этот подход можно использовать, если донорно-акцепторные свойства исследуемых компонентов заранее известны.

При приготовлении смешанных элюентов важно обратить внимание на точную дозировку компонентов, поскольку даже небольшие изменения состава смеси могут привести к изменению величин R_f и к изменению разделения исследуемой смеси. Так, Никольс [26] нашел, что при разделении липидов с применением растворителей на основе смеси диизобутилкетона и уксусной кислоты редко удавалось добиться удовлетворительного разделения, если в смеси присутствовало больше четырех частей воды. В то же время смесь, содержащая 3,6—3,8 частей воды, оказалась наилучшим элюентом для обычных разделений. (В настоящей книге везде состав смесей приведен в объемных единицах, за исключением специально оговоренных случаев и тех случаев, где явно напрашивается массовое соотношение, например для смесей адсорбентов)

В качестве примера того, сколь сложными по составу могут быть испытуемые пробы и применяемые для их разделения смеси растворителей, можно привести работу Кунца и Козина [27], посвященную разделению фосфолипидов плазмы. Растворитель, составленный для разделения 12 соединений, содержал 22 компонента, в том числе многочисленные неорганические ионы (см. гл. XXIII, разд. 7). Кроме того, для получения нужных результатов разделение проводили на слое из смеси двух силикагелей.

Прежде чем повторно использовать смесь растворителей, следует выяснить, не изменился ли ее состав вследствие испарения. Чтобы исключить вероятность изменения состава смеси, Рёдер [28] проводил разделение азеотропными смесями. Он приводит 21 азеотропную смесь для разделения эстрогенов, гестогенов, алкалоидов, сульфонамидов, психотропных лекарственных препаратов, наркотиков и местных обезболивающих средств. Такие смеси растворителей можно использовать повторно. С азеотропными смесями, содержащими полярные компоненты в низких концентрациях, нельзя проводить более десяти хроматографических разделений, поскольку концентрация полярного компонента меняется настолько, что это влияет на разделение. Менти и Эмундсон [29] исследовали возможность применения водно-спиртовых растворов неорганических солей для устранения эффекта испарения.

Другим фактором, который следует принимать во внимание при разделении летучих жидкостей, является изменение состава растворителя вследствие улетучивания хроматографируемых веществ с пластинки и соответствующего повышения концентрации самого растворителя.

Вопросам чистоты растворителей, применяемых в ТСХ, необходимо уделять большое внимание, поскольку в литературе описано множество ошибок, обусловленных наличием примеси. В частности, найдено, что в хлороформе марки ч. д. а., использованном для разделения липидов, в качестве примеси присутствовал эфир себациновой кислоты [30]. В эфире и продажном бензоле высокой чистоты найден дибутилфталат [31, 32]. Баке [33] выделил из ацетона флуоресцирующую примесь. Кросби и Аронсон [34] пытались найти флуоресцирующие примеси в ряде растворителей. Из числа исследованных растворителей наиболее загрязненным оказался этилацетат марки ч. д. а., содержащий до 10 мг/л примесей. Авторы [34] установили, что из растворителя можно почти полностью удалить флуоресцирующие примеси, если пропустить его через колонку с активным углем и затем перегнать. Примеси, присутствующие в растворителях, вредны не только непосредственно (при хроматографических разделениях), но и косвенно в тех случаях, когда для экстрак-

ции природных продуктов используются большие объемы растворителей. При этом примеси обычно концентрируются в экстрактах.

2. ВОСХОДЯЩЕЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

До настоящего времени подавляющее большинство работ по ТСХ выполнено методом восходящего элюирования. По всей вероятности, объясняется это простотой метода и применяемой аппаратуры. В общем случае для восходящего элюирования пригоден любой закрытый контейнер, в котором можно закрепить пластинку в вертикальном или почти вертикальном положении. Желательно, чтобы объем контейнера был по возможности меньше. Фирмы, выпускающие оборудование для ТСХ, поставляют камеры для разделения разных форм и размеров.

Эббот и сотр. [35] нашли, что угол, под которым пластинка закреплена в контейнере, влияет как на форму пятен, так и на скорость разделения. Если пластинка наклонена назад, скорость проявления возрастает, однако пятна становятся более размытыми. Если наклонить пластинку вперед, перейдя вертикальное положение, скорость проявления снова возрастает, однако пятна в этом случае более четкие. Авторы цитируемой работы рекомендуют в качестве оптимального угол между слоем адсорбента и поверхностью растворителя в 45° .

Восходящее элюирование проводят несколькими способами. Можно налить на дно камеры для разделения слой растворителя толщиной 5—10 мм. Если необходимо хроматографировать в атмосфере, насыщенной растворителем, стенки камеры выстилают фильтровальной бумагой, края которой погружают в растворитель. Это способствует насыщению атмосферы камеры. Затем вводят в камеру пластинку с нанесенной на нее пробой и погружают нижний край пластинки в растворитель.

В камере средних размеров можно одновременно элюировать всего две пластинки, прислонив их к противоположным стенкам. Рози и Гамильтон [36] наносили адсорбент на обе стороны пластинок, чтобы увеличить число одновременно элюируемых хроматограмм. Сначала покрывали и высушивали одну сторону пластинки, после чего легко можно было сделать ту же операцию с другой ее стороной. При нанесении проб пластинку устанавливали на подставку в виде простой рамки, на которую она опиралась краями, так что слой адсорбента рамки не касался. Сконструированы и другие устройства, позволяющие элюировать одновременно несколько пластинок. Два таких устройства изображены на рис. 5.1. Найбом [39] собирал пластинки в стопку, помещая по четыре пластиковые шайбы по углам между каждой парой пластинок. Собранную таким образом стопку он накрывал

еще одной стеклянной пластинкой без адсорбента, стягивал полученный пакет резиновыми кольцами и помещал в камеру для разделения. Расстояние между пластинками составляло всего 2—3 мм, что позволило уменьшить объем паровой фазы в камере. Фактически эта конструкция представляет собой вариант «сэндвичевой пластинки», описанной ниже. Фирма SAMAG выпускает приспособление, позволяющее проявлять одновременно пять пластинок, которые также складываются в стопку. Слоун-

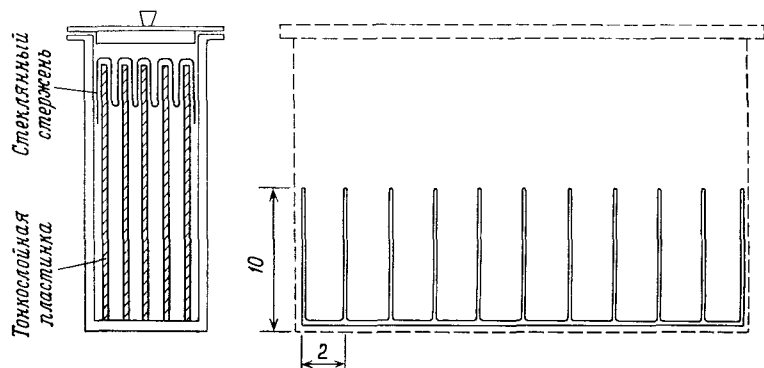


Рис. 5.1. Устройство для одновременного элюирования серии пластинок Слева система Бреннера и Нидервизера [37], справа система Юриона и сотр. [38].

Стенли и Боулер [40] сконструировали для той же цели штатив из стеклянного стержня и полиэтиленовой пластинки, а Уоллиш и сотр. [41] — приспособление из стеклянного стержня и полоски из нержавеющей стали. Форд [42] ввел в камеру для разделения две сжатые пружины таким образом, чтобы они удерживались благодаря давлению их концов на стенки. В такой камере можно одновременно обрабатывать несколько гибких полосок с адсорбентом или хроматографических пластинок. В продаже имеется также ряд держателей для пластинок, различающихся конструкцией и размерами. Они позволяют работать с пластинками размерами от 5×20 см и до 1 м×20 см (фирма Shandon Scientific Co.). Фирма Kensington Scientific Corp. разработала штатив для двух пластинок. Аналогичные приспособления выпускают фирмы SAMAG и Analtech. Держатели сконструированы таким образом, чтобы пластинки можно было сначала поместить в камеру над поверхностью жидкости с тем, чтобы в камере установилось равновесие между пластинками, атмосферой камеры и растворителем. По установлении равновесия пластинки можно опустить в растворитель, не открывая камеру. Эту операцию можно выполнить и другим способом: укрепить пластинки на

стеклянных стержнях над поверхностью растворителя в камере и выждать время, достаточное для насыщения атмосферы и пластинок парами растворителя, после чего через отверстие в крышке камеры добавить растворитель с таким расчетом, чтобы нижние края пластинок погрузились в растворитель и началось элюирование с целью получения хроматограмм. В другом варианте этого метода с нижней части пластинки соскабливают адсорбент [43], чтобы установленная в камеру пластинка опиралась на дно камеры, но уровень растворителя был ниже слоя адсорбента. По установлении равновесия в камеру добавляют еще некоторое количество растворителя с тем, чтобы он касался адсорбента.

Сенкоф и Соуркис [44] предложили перед началом разделения выливать из камеры старый растворитель и заменять его свежим. В этом случае стенки камеры можно не покрывать фильтровальной бумагой. Енсен [45] проводил хроматографирование в атмосфере аммиака, и поскольку попытки добавлять аммиак непосредственно в элюент оказались неудачными, он ставил в камеру отдельный сосуд с раствором гидроксида аммония.

При элюировании пластинок в ненасыщенной камере фронт растворителя в центре пластинки может двигаться быстрее, чем по краям, в результате пятна одного и того же соединения расположатся на слое не рядом, а по дуге. Этот эффект объясняется испарением растворителя с краев пластинки. Расположение пятен может меняться в зависимости от летучести растворителя, температуры и скорости элюирования. Чтобы устранить это явление, камеру необходимо насытить парами растворителя, как уже говорилось выше. Можно также соскоблить адсорбент с краев пластинки [43]. Так, Карпичка [46] не получил удовлетворительных результатов при работе с камерами для разделения, выстланными фильтровальной бумагой, и использовал для разделения пластинки со слоем адсорбента в виде клина, расширяющегося кверху.

Разумеется, в камерах с минимальным объемом типа сэндвичевых, а также при элюировании пробы на узких хроматографических полосках в пробирках описанный краевой эффект отсутствует.

Существует еще одно приспособление для восходящего хроматографирования, называемое «сэндвичевой пластинкой» [47—50]. С трех краев хроматографической пластинки удаляют адсорбент и на свободную поверхность накладывают прутки или прокладку, сделанные из стекла, металла или пластика. Пробу наносят на тот край пластинки, откуда адсорбент не удален, затем накладывают на свободные от адсорбента края U-образную разделительную прокладку, а на нее адсорбентом внутрь —

вторую пластинку. Полученный пакет скрепляют пружинными зажимами и погружают края пластинок с нанесенными пробами в элюент. При этом получается очень узкая камера, для насыщения которой парами растворителя нужно очень непродолжительное время. Однако, если смесь растворителей содержит и тяжелые, и легкие компоненты (например, четыреххлористый углерод и гексан), пары этих компонентов в камере такого типа стремятся разделиться. Пары более тяжелого четыреххлори-

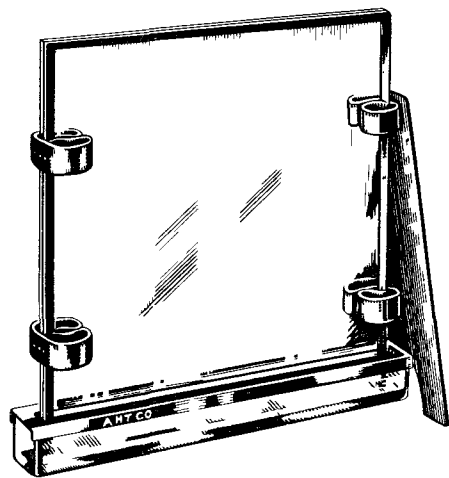


Рис 52 Штатив фирмы SAMAG для тонкослойной хроматографии (с разрешения Arthur H Thomas Co)

стого углерода концентрируются ближе ко дну камеры, а пары гексана поднимаются вверх, что приводит к неоднородному насыщению камеры [48]. При применении «сэндвичевой пластинки» пятна разделенных компонентов меньше, чем на обычных пластинках, а краевой эффект отсутствует. Уосики [50] использовали две пластинки, покрытые адсорбентом, которые складывались «лицом к лицу»; таким путем адсорбционная емкость удваивалась. Сэндвичевые пластинки выпускают фирмы SAMAG (рис 52) и Desaga (рис. 53). В устройстве фирмы Desaga покрывающие пластинки имеют бортик из плавленного стекла, поэтому в этом случае складывать две хроматографические пластинки «лицом к лицу» нельзя. Фирма Eastman Kodak изготавливает сэндвичевую камеру для гибких пленок, а фирма Gelman — пластиковую камеру для пленок размером 65×100 мм.

Пластинки со свободным слоем нельзя проявлять в вертикальном положении; обычно их устанавливают под углом около 20° (термин «свободный слой» более удачен для этого типа хроматографии, чем «незакрепленный слой», поскольку есть такие адсорбенты, которые не содержат связующего, но которые тем

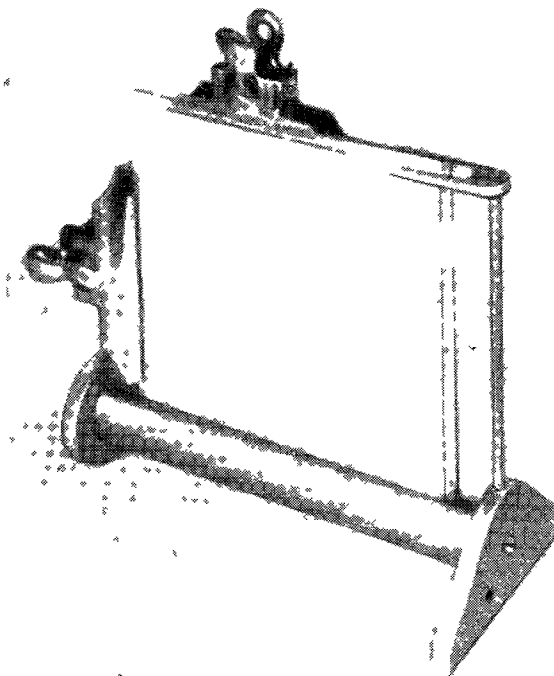


Рис 53 «Сэндвичевая плата» фирмы Desaga (с разрешения Brinkmann Instruments).

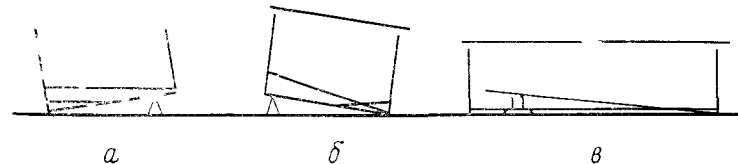


Рис 54 Камера для разделения, предназначенная для пластинок с незакрепленным слоем адсорбента [51] (с разрешения автора и изд Академии наук СССР)

a — положение камеры во время установки пластинки *б в* — положение камеры в процессе разделения

не менее можно проявлять в вертикальном положении)*. На рис. 5.4 показано, как обычно проводится хроматографирование на свободном слое [51]. Давидек и Давидкова [52] использовали аналогичный метод, только растворитель помещали в отдельном сосуде внутри камеры для разделения.

3. НИСХОДЯЩЕЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Нисходящее элюирование обычно используют для непрерывного элюирования при работе с медленно движущимися по слою соединениями. Во многих случаях этим методом можно достичь

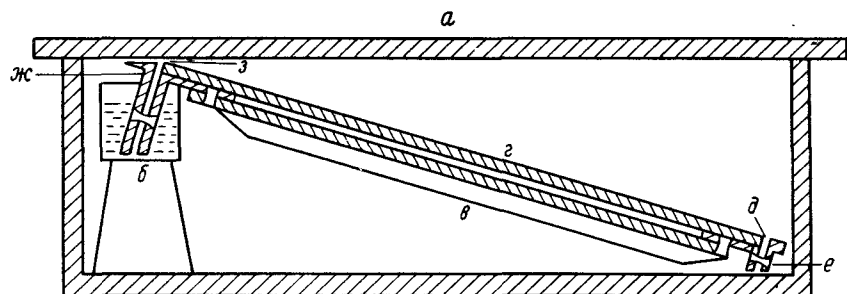


Рис. 5.5. Устройство для нисходящего элюирования пластинок с незакрепленным слоем [54] (с разрешения автора и Elsevier Publishing Co.).

а — контейнер (34×10 см) с пришлифованной крышкой; б — резервуар с растворителем (24×3,5×3 см); в — несущая рама; г — стеклянная пластинка (24×24 см); д — щели для капиллярной подачи растворителя или для бумажных фитилей; е, ж — направляющие для выравнивания слоя адсорбента.

лучшего разделения в результате увеличения длительности элюирования, а не использования более полярного растворителя.

Лепп и Эрали [53] первые провели нисходящее хроматографирование на незакрепленных слоях. Мистрюков [54] для этой же цели разработал прибор, изображенный на рис. 5.5. Растворитель подается на пластинку и удаляется с нее либо через узкие щели, либо с помощью полосок фильтровальной бумаги.

* Предлагаемая новая терминология не представляется достаточно обоснованной. Название «закрепленный слой» отражает прежде всего то, что частицы сорбента скреплены с подложкой и между собой, а не механизм закрепления слоя на подложке. Используются ли для закрепления слоя специальные связующие или не используются (например, при спекании сорбента), этот термин не отражает. В термине «свободный слой», предлагаемом вместо термина «закрепленный слой», терминологическое и смысловое значения различны. Поэтому в переводе используются прежние термины «закрепленный слой» и «незакрепленный слой», которые приняты в советской научной литературе (см., например, Кибардин С. А., Макаров К. А. Тонкослойная хроматография в органической химии.— М.: Химия, 1978).— Прим. ред.

Иоханссон и Раймо [55] в качестве держателя для пластинок со свободным слоем сефадекса использовали прибор для электрофореза. Фирма Pharmacia выпускает прибор для тонкослойной

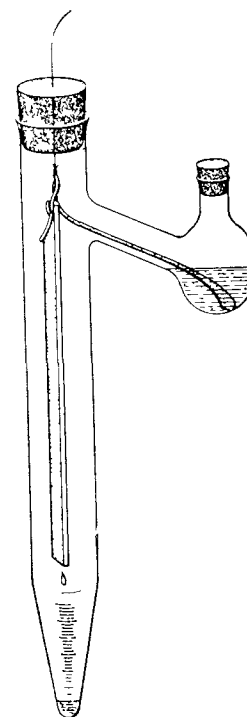


Рис. 5.6. Хроматографическая полоска с кремневой кислотой, снабженная фитилем из фильтровальной бумаги для подачи растворителя из бокового отвода пробирки (нисходящее элюирование) [Stunley et al., Food Technol., 15, 382 (1962)].

гель-хроматографии на сефадексах, однако он изготовлен из пластика и непригоден для растворителей, применяемых в других видах нисходящей ТСХ. Стенли и Венье [56] впервые в 1957 г. применили нисходящее элюирование в хроматографии на закрепленных слоях. Сконструированный ими прибор (рис. 5.6) предназначен для работы с узкими «хроматографическими полосками» [57]. Полоску, покрытую адсорбентом, подвешивают к пробке и с помощью полоски фильтровальной бумаги на слой подают растворитель. Фирма Research Specialities выпускает модификацию этого устройства, снабженную сменной пробиркой для сбора элюата и резервуаром для растворителя с краном, позволяющим слить и заменить растворитель. Приспособление Стенли и сотр. [58] для предварительной промывки слоя адсорбента нисходящим потоком растворителя было в слегка модифицированном виде приспособлено Сейкелем и сотр. [59] для непрерывной нисходящей ТСХ (рис. 5.7). Бер-

кофер и сотр. [60], Гельдель и сотр. [61], Рейзерт и Шумахер [62] и Золлнер и Уолфром [63] описали различные устройства для нисходящего ТСХ. Чтобы удалить растворитель с нижнего края пластинки, Сейкель и сотр. [59] прижимали этот край к прокладке из фильтровальной бумаги, и Гельдель и сотр. [61]

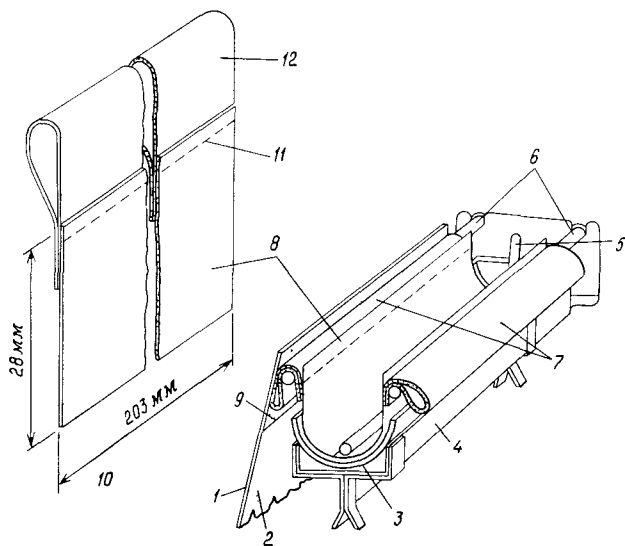


Рис. 5.7. Схема устройства для непрерывного нисходящего элюирования тонкослойных пластинок [59] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.).

1 — хроматографическая пластинка; 2 — слой адсорбента; 3 — стеклянный желоб для растворителя; 4 — металлический лоток; 5 — анкерный пруток; 6 — антисифонные прутки; 7 — фланель; 8 — хроматографическая бумага; 9 — черта; 10 — фитиль; 11 — шов; 12 — петля из хлопчатобумажной фланели.

использовали для этой же цели кювету, заполненную диатомитовой землей. По утверждению Рейзерта и Шумахера [62], при слишком большом наклоне пластинки элюирование происходит неравномерно, поэтому наклон не должен превышать 10° от горизонтали.

4. ГОРИЗОНТАЛЬНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ *

Линейное элюирование

Мистрюков [64] использовал для горизонтального элюирования пластинок со свободным слоем адсорбента мелкую кювету с притертой стеклянной крышкой. Пластинка укреплялась на

Т-образной стеклянной стойке и край пластинки прижимался к фильтровальной бумаге другой стеклянной пластинкой. Растворитель поднимался из кюветы по фильтровальной бумаге и подавался на слой адсорбента. Хессе и Александер [65] для элюирования проб на пластинках с закрепленным слоем укрепляли их горизонтально, обратив слоем к кювете с растворителем — элюентом. Растворитель подавали на слой посредством полоски из фетра.

Радиальное и круговое элюирование

В принципе оба эти способа идентичны. Круговое хроматографирование на пластинке дает concentрические кольца, поскольку пробу наносят в центр пластинки. При радиальном хроматографировании пробу наносят на одну сторону от центра и в результате образуются не кольцевые, а дугообразные полосы. Оба эти метода менее универсальны, чем различные виды линейной хроматографии.

Радиальная хроматография уводит нас в прошлое, к первым годам существования тонкослойной хроматографии.

Капельно-хроматографический метод Измайлова и Шрайбера [8] был фактически микровариантом круговой хроматографии на свободных слоях. Кроув [9] проводил полукруговое элюирование, а Мейнхард и Холл [66] — радиальное хроматографирование неорганических ионов на закрепленных слоях с применением специальной пипетки для подачи растворителя. Брайант [67] в 1955 г. осуществил радиальное хроматографирование на хроматографической пластинке, обращенной слоем вниз. Кашекой для разделения служила чашка Петри диаметром 12,5 см, в которую наливали растворитель. Растворитель подавали в центр пластинки с помощью ватного фитиля, закрепленного в металлическом зажиме. Скорость элюирования зависела от диаметра фитиля и площади его контакта с пластинкой. Шервуд [68] и Литт и Джол [69] сконструировали специальные приспособления для элюирования прямоугольных пленок или пластинок, позволяющие работать с готовыми пластинками. Ван Оой [70] подробно описал устройство для кругового электрофореза.

Недавно предложен новый метод, получивший название «высокоэффективная тонкослойная хроматография» (ВЭТСХ) [71]. В этом методе применяется разработанный Халпапом [72] особый тип силикагеля, разделяющая способность которого и оптические свойства лучше, чем у обычных препаратов. Этот силикагель отличается очень мелкой дисперсностью и очень узким распределением зерен по размерам. Поскольку скорость движения растворителя по слою такого силикагеля меньше, чем обычно, разделение проводят на пластинках меньших размеров.

* О непрерывном элюировании говорится также в разд. 5.

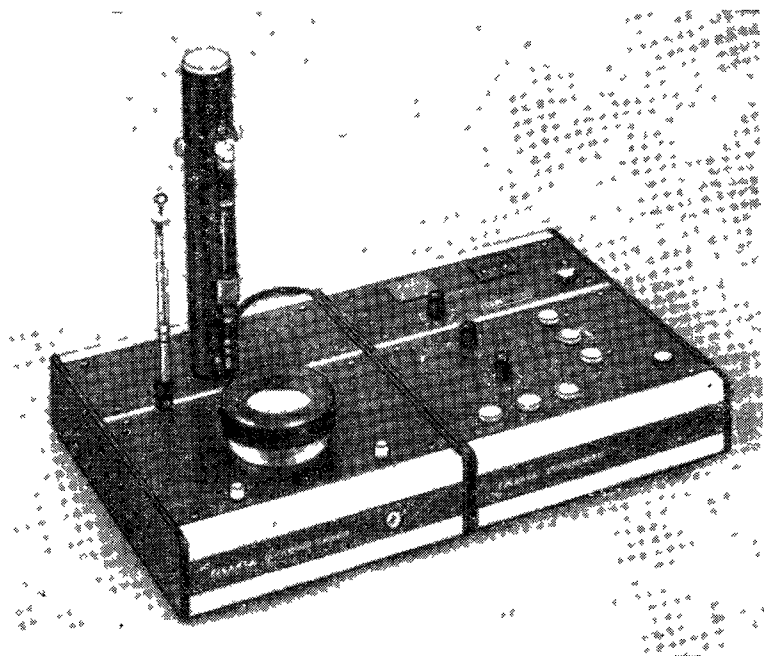


Рис 58 Устройство для тонкослойной хроматографии высокого разрешения (ТСХВР) (с разрешения SAMAG Inc).

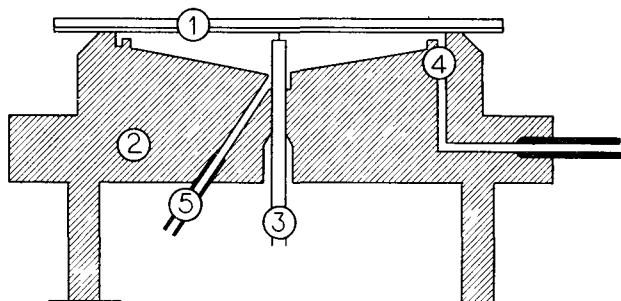


Рис 59 Схематический разрез U образной камеры для ТСХВР (с разрешения SAMAG).

Пластинку для ТСХВР размером 50×50 мм (1) кладут сном вниз на корпус камеры (2) Элюент подают в центр пластинки по платино-иридиевому капилляру (3) (вн. диам. 0,2 мм). Паровая фаза для поддержания насыщения слоя подается через кольцевой канал (4) и выходит через трубку (5).

Фирма SAMAG выпускает приспособление, позволяющее осуществить радиальное и круговое тонкослойное хроматографирование высокого разрешения (ВЭТСХ) (рис. 58). На рис. 5.9 показано это приспособление (U-образная камера) в разрезе. Растворитель подают на пластинку с постоянной скоростью с помощью шприца, снабженного ступенчатым электроприводом с электронной регулировкой. Пробы для радиальной хроматографии наносят на сухой слой в виде круглых пятен диаметром 3, 4, 5 или 6 мм или через капилляр, подающий растворитель (для кругового элюирования). В последнем случае при использовании заранее увлажненного слоя полученные результаты можно непосредственно применить в жидкостной хроматографии высокого разрешения. Фирмы Merck и SAMAG выпускают готовые хроматографические пластинки под названием «силикагель 60F-254 for Nano-TLC».

5. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛЮИРОВАНИЯ

Непрерывное элюирование

Об этом методе мы уже упоминали в разделе, посвященном нисходящему элюированию, поскольку оно используется именно в этом методе. Однако разработаны и другие методы непрерывной ТСХ. Один из способов создания непрерывного потока растворителя по слою адсорбента состоит в испарении растворителя, достигшего конца слоя. Этот метод впервые был применен Мотье [73] и Мотье и Поттератом [74] при восходящей хроматографии на свободном слое оксида алюминия. Зольнер и Уолфром [63] таким же методом получали восходящие хроматограммы на закрепленном слое. В этом случае, чтобы растворитель испарялся, просто приподнимали с одного края крышку камеры для разделения. Трутер [75] применил специальную крышку со щелью, в которую вставлялась пластинка. Как только растворитель поднимался за пределы камеры, он непрерывно испарялся. Либби и Дей [76] применяли крышку со щелью, изготовленную из сарана. Энуор [77] использовал аналогичный принцип для хроматографии на узких полосках. На конце полоски укреплялся бумажный фитиль, по которому растворитель выходил через пробку наружу и испарялся. Тот же способ был применен для пластинок размером 20×20 см [78, 79] Стюарт и сотр. [80, 81] рассмотрели теоретические аспекты этого типа ТСХ.

Основываясь на описанном методе, Бреннер и Нидервизер [82, 83] сконструировали устройство (рис. 5.10) для непрерывной горизонтальной ТСХ. Устройство собирают после нанесения пробы на пластинку. Растворитель подают на пластинку из

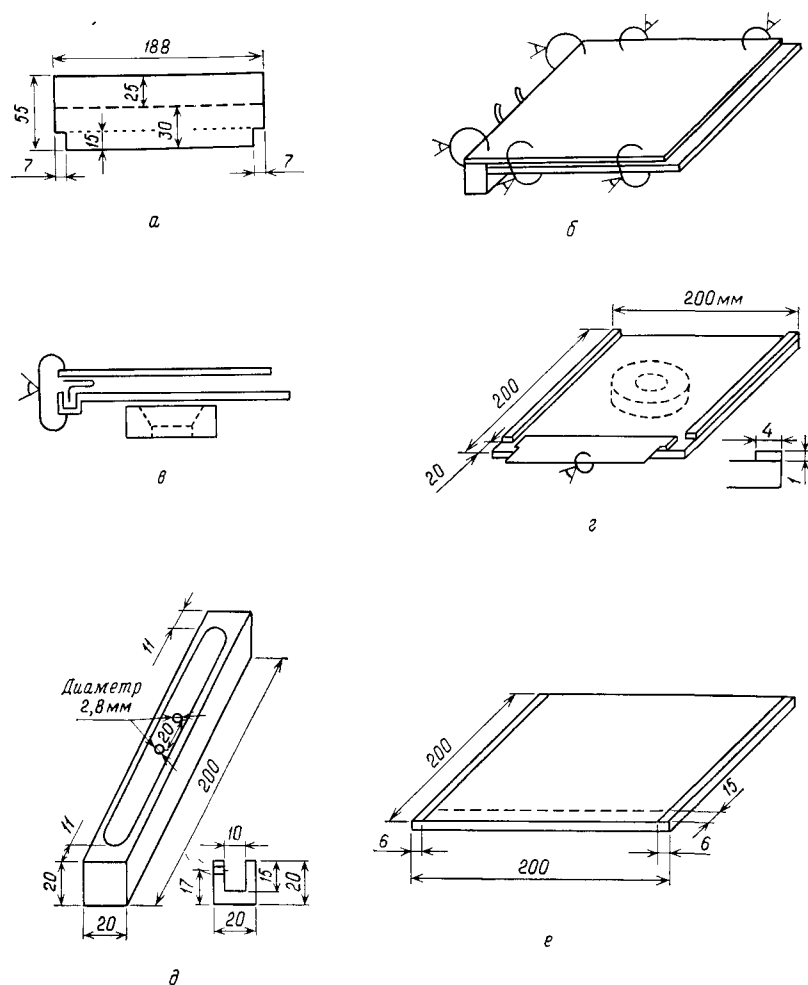


Рис. 5.10. Устройство для непрерывного горизонтального хроматографирования [83] (с разрешения авторов и Birkhaeuser Verlag).

a — фитиль из фильтровальной бумаги для подачи растворителя из резервуара *d* на хроматографическую пластинку *e*, с двух противоположных краев которой адсорбент удален, чтобы удобнее было установить полоски, поддерживающие покрывающую пластинку; *z* — пластинка установлена на пробковом кружке, *d* — резервуар для растворителя из нержавеющей стали, снабженный двумя отверстиями для полиэтиленовых трубок, через которые добавляют растворитель; *b* — устройство в сборе, *в* — вид сбоку (боковые подставки удалены). Все размеры даны в миллиметрах

кюветы посредством полоски фильтровальной бумаги. Слой адсорбента покрывают второй стеклянной пластинкой, опирающейся на узкие стекла, установленные на краях хроматографической пластинки. Один край слоя адсорбента оставляют открытым, и растворитель, достигнув этого края, может испаряться. Пластинки скрепляют пружинными зажимами. Все устройство в целом можно считать предшественником современной «сэндвичевой пластинки». Модифицированный вариант такого устройства выпускается фирмой Desaga. Непрерывное хроматографирование с испарением растворителя можно также проводить в камере Vagio-KS фирмы SAMAG. В выпускаемом фирмой этом варианте устройства один край пластинки снабжен нагревателем для ускорения испарения растворителя, а остальную ее часть можно охлаждать, чтобы избежать конденсации паров на покровной пластинке. С помощью этого устройства можно проводить также хроматографическое разделение при пониженных температурах. Лис и сотр. [84] описали простой прибор для непрерывной горизонтальной хроматографии. Хара и сотр. [85, 86] применили метод Бреннера и Нидервизера для хроматографии на вертикальных «сэндвичевых пластинках».

Прохазка [51] использовал другой способ создания непрерывного потока растворителя. При работе со свободным слоем адсорбента он помещал в верхней части наклонной пластинки более толстый слой — «валик» адсорбента, и растворитель, достигнув конца пластинки, сорбировался этим «валиком». Бенетт и Хефтмен [87] проводили восходящее хроматографирование на закрепленных слоях, руководствуясь этим же принципом. Они помещали свободный адсорбент в алюминиевый желобок, укрепленный на верхнем краю пластинки. Шварц модифицировал данный метод (по данным Леблера [88]), с тем чтобы увеличить емкость системы. По предложенной им методике хроматографическую пластинку устанавливают под углом примерно в 20° и соединяют с нисходящей пластинкой небольшим валиком из адсорбента. Вторую пластинку погружают в чашку Петри, заполненную свободным адсорбентом, который способен поглотить значительное количество растворителя.

Иоханссон и Кашемсанта [89] при препаративной нисходящей хроматографии применили метод, в котором элюат собирается на острие специального коллектора и затем стекает с него вниз. Пробы наносят на адсорбент в виде полосок.

Ван Дийк [90] сконструировал прибор для непрерывной хроматографии, в котором слой адсорбента наносят на внутреннюю поверхность стеклянной трубки длиной 200 мм и диаметром 6 мм. Верхний конец трубки закрывают пористой стеклянной пластинкой. Пробу наносят у нижнего края сорбента и элюируют пробу восходящим методом. Когда растворитель дости-

гает верхнего края слоя адсорбента, его передавливают в капилляр сжатым воздухом из баллона, присоединенного к камере для разделения, и направляют фракции в детектирующее устройство или в коллектор. В модифицированном варианте [91] этого метода адсорбент наносят на плоский диск диаметром 230 мм, пробу наносят в виде кольца и разделение ведут в направлении от центра. Проявительная камера снабжена желобком, что позволяет менять состав паровой фазы. Де-Дейн и Веттерс [92] видоизменили методику хроматографирования таким образом,

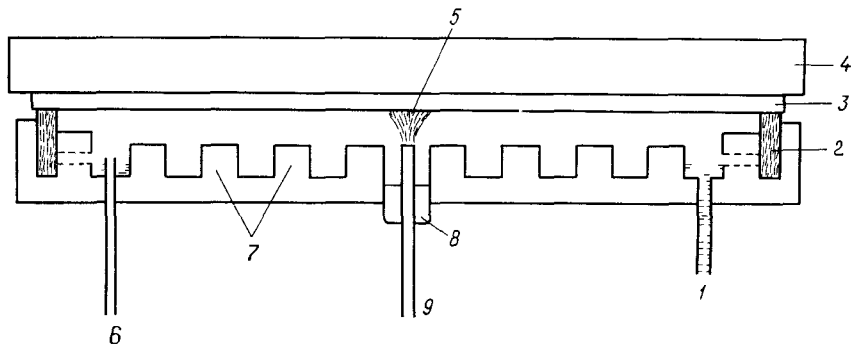


Рис 5.11. Схема устройства для разделения «от краев к центру» [92] (с разрешения авторов и Elsevier Publishing Co).

1 — ввод элюента, 2 — войлочная лента, 3 — слой адсорбента, 4 — стекляннная подложка; 5 — кусок ваты, 6 — вывод избыточного элюента, 7 — перегородка для создания градиента концентрации в паровой фазе, 8 — резиновое уплотнение, 9 — трубка из фторопласта диаметром 1 мм (наружи)

чтобы можно было использовать имеющиеся в продаже прямоугольные пластинки. В зависимости от типа примененной системы распределения и сбора растворителя элюент удаляется под действием капиллярных сил и силы тяжести. На рис. 5.11 показана схема предложенной этими авторами установки.

Турина и сотр. [93] применили элюирование одновременно двумя разными растворителями с двух сторон треугольной хроматографической пластинки. Разделяемую смесь помещали вблизи вершины этого треугольника, а разделенные фракции выводили с основания пластинки посредством полоски бумаги. Пробу и растворитель подавали на пластинку с помощью аналогичного приспособления. Этим методом разделяли раствор, содержащий хлорид железа(II) и хлорид кобальта. Турина и Марьянович-Крайован [94] разработали также непрерывный метод ТСХ, основанный на медленном вращении пластинки, покрытой адсорбентом. Каждому соединению на пластинке соответствовала определенная спиральная линия. Визер [95] описал довольно сложный прибор для непрерывного препаратив-

ного хроматографического разделения веществ. Адсорбент наносили на бесконечную движущуюся ленту, высушивали слой, непрерывно наносили пробу, а элюент-растворитель подавали с одного края ленты в направлении поперек ленты. После прохождения ленты через зону высушивания адсорбент с разделенными компонентами соскребали с поверхности ленты.

Дитрич [96] разработал приспособление для непрерывного фракционирования белков и мукополисахаридов методом непрерывной гель-фильтрации и электрофореза.

Множественное элюирование

Множественное элюирование было впервые предложено Джинсом и сотр. [97] для бумажной хроматографии. Мотье и Поттерат [74] первыми использовали этот метод в тонкослойной хроматографии.

Сущность метода состоит в множественном элюировании хроматограммы одним и тем же растворителем. Хроматограмму элюируют выбранным растворителем, извлекают пластинку из камеры, дают ей высохнуть, снова помещают в камеру и элюируют во второй раз. Элюирование можно повторить еще несколько раз, пока не будет достигнуто нужное разделение. Число повторных элюирований зависит от расстояния, на которое нужно переместить вещество. Вследствие различия величин R_f двух данных соединений (и, следовательно, скоростей их перемещения растворителем) при повторных элюированиях их пятна будут все больше разделяться, пока расстояние между ними не достигнет некоторой величины, после чего эти пятна начнут сближаться. Объяснить такое необычное перемещение пятен можно тем, что растворитель вначале достигает пятна соединения с меньшим значением R_f и начинает перемещать его, а уже потом достигает пятна второго соединения. Если этот процесс повторять, то расстояние, на которое перемещается соединение с меньшим R_f до того, как начнет перемещаться соединение с большим R_f , с каждым последующим элюированием увеличивается, а расстояние, на которое первое соединение перемещается после того, как начнет перемещаться второе соединение, с каждым разом уменьшается.

Теоретические аспекты множественного элюирования рассмотрены в работах Джинса и сотр. [97], Тома [98, 99], Старка и Хемпла [100] и Ленка [101]. Определить число элюирований необходимых для достижений той или иной степени разделения двух веществ с данными значениями R_f , можно при помощи табл. 5.3—5.6, заимствованных из работы Тома [99]. Делают это так. Прежде всего задают нужную степень разделения, после чего находят в левом столбце подходящей таблицы величину R_f ,

Таблица 53
Число элюирований, необходимое для разделения двух веществ до степени 0,1, при различной длине слоя [99]^{а, б}

R_f быстро движущегося компонента $\times 100$	R_f медленно движущегося компонента $\times 100$								Разделение невозможно
	Число элюирований, необходимое для разделения								
	2	3	4	5	6	7	8	9-14	
30	23-21								24-29
29	22-20								23-28
28	21-19	22							23-27
27	20-18	21							22-26
26	19-17	20							21-25
25	18-16	19							20-24
24	17-15	18							19-23
23	16-14	17	18						19-22
22	15-13	16	17						18-21
21	14-12	15	16						17-20
20	13-11	15-14							16-19
19	13-10	14							15-18
18	12-9	13			14				15-17
17	11-8	12		13					14-16
16	10-7	11	12						13-15
15	9-6	10	11						12-14
14	8-5	9	10						11-13
13	7-4	8	9			10			11-12
12	6-3	7	8		9				10-11
11	5-2	6	7	8					9-10
10	4-1	6-5		7					8-9
9	3-1	5-4		6					7-8
8	2-1	4-3		5				6	7
7	1	3-2	4						6
6		2-1	3			4	5		5
5		1	2			3			5
4			1			2		3	
3						1		2	
2								1	

^а С разрешения автора и Elsevier Publishing Co.

^б Чтобы определить число элюирований, необходимое для указанного разделения, находят значение R_f более подвижного компонента в левом столбце таблицы. В той же строке справа от найденной цифры находят значение R_f менее подвижного компонента. Число элюирований, необходимое для разделения этих двух компонентов, находят в верхней строке таблицы в столбце, соответствующем менее подвижному компоненту.

Таблица 54
Число элюирований, необходимое для разделения двух веществ до степени 0,08, при различной длине слоя [99]^а

R_f быстро движущегося компонента $\times 100$	R_f медленно движущегося компонента $\times 100$								Разделение невозможно
	Число элюирований, необходимое для разделения								
	2	3	4	5	6	7	8	9-14	
30	24-23								25-29
29	23-22	24							25-28
28	22-21	23							24-27
27	21-20	22							23-26
26	20-19	21							22-25
25	19-18	20							21-24
24	18-17	19							20-23
23	17-16	18							19-22
22	17-15		18						19-21
21	16-14		17						18-20
20	15-13	16							17-19
19	14-12	15							16-18
18	13-11	14							15-17
17	12-10	13							14-16
16	11-9	12		13					14-15
15	10-8	11		12					13-14
14	10-9	11				12			13
13	9-8	10			11				12
12	8-7	9		10					11
11	7-6	8		9					10
10	6-5	7	8						9
9	5-4	6	7						8
8	4-3	5	6						7
7	3-2	4	5						6
6	2-1	3	4					5	
5	1	2	3					4	
4		1	2					3	
3			1				2		
2						1			

^а См. примечание к табл. 53.

Таблица 5 5

Число элюирований, необходимое для разделения двух веществ до степени 0,06, при различной длине слоя [99]^a

R_f быстро движущегося компонента $\times 100$	R_f медленно движущегося компонента $\times 100$								Разделение невозможно
	Число элюирований, необходимое для распределения								
	2	3	4	5	6	7	8	9-14	
30	25	26							27-29
29	24	25							26-28
28	23	24							25-27
27	23-22								24-26
26	22-21								23-25
25	21-20								22-24
24	20-19								21-23
23	19-18								20-22
22	18-17		19						20-21
21	17-16		18						19-20
20	16-15		17						18-19
19	15-14	16							17-18
18	14-13	15							16-17
17	13-12	14							15-16
16	12-11	13							14-15
15	11-10	12							14-13
14	10-9	11				12			13
13	9-8	10			11				12
12	8-7	9		10					11
11	7-6	8		9					10
10	6-5	7	8						9
9	5-4	6	7						8
8	4-3	5	6						7
7	3-2	4	5						6
6	2-1	3	4					5	4
5	1	2	3					4	3
4		1	2				3		2
3			1						1
2									

^a См. примечание к табл. 5.3.

Таблица 5 6

Число элюирований, необходимое для разделения двух веществ до степени 0,04, при различной длине слоя [99]^a

R_f быстро движущегося компонента $\times 100$	R_f медленно движущегося компонента $\times 100$								Разделение невозможно
	Число элюирований, необходимое для разделения								
	2	3	4	5	6	7	8	9-14	
30	27								28-29
29	26								27-28
28	25								26-27
27	24								25-26
26	23								24-25
25	22								23-24
24	21								22-23
23	20								21-22
22	19								20-21
21	18		19						20
20	17		18						19
19	16	17							18
18	15	16							17
17	14	15							16
16	13	14							15
15	12	13							14
14	11	12							13
13	10	11							12
12	9	10							11
11	8	9							10
10	7	8						9	
9	6	7					8		
8	5	6				7			
7	4	5				6			
6	3	4				5			
5	2	3	4						
4	1	2	3						
3		1	2						
2			1						

^a См. примечание к табл. 5.3.

соответствующую более подвижному компоненту, а в той же строчке справа значение R_f менее подвижного компонента. Число элюирований, необходимое для разделения этих двух компонентов, находят в верхней строке таблицы в столбце, соответствующем менее подвижному компоненту. Халпаап [102] использовал этот метод в препаративной тонкослойной хроматографии. В связи с этим приведенные им таблицы предусматривают большее разделение, чем таблицы Тома. Аналогичные таблицы приведены в работе Петровича [102а]. Гольдстейн [102б] для той же цели пользовался специальным графиком.

Автоматизированное многократное элюирование описано в настоящей главе в разделе, посвященном автоматизированной ТСХ.

Ступенчатое элюирование

В этом методе хроматограмму получают до различной высоты разными растворителями. Иначе говоря, вместо многократного элюирования одним и тем же растворителем применяют разные растворители и при каждом элюировании дают растворителю подняться по слою адсорбента до различной высоты. Этот метод (ранее применявшийся в бумажной хроматографии) был впервые использован в 1951 г. Миллером и Кирхнером [103] для разделения веществ на «хроматографическом столбике». Последний представляет собой модификацию ТСХ на колонке адсорбента круглого сечения без оболочки (более подробно описание «хроматографического столбика» дано в гл. X). В цитируемой работе методом ступенчатого элюирования были разделены три терпена: лимонен, терпенилацетат и α -терпинеол. На «хроматостолбике» вначале пробу элюировали гексаном на две пятых его длины, после чего столбик переносили в 15 %-ный раствор этилацетата в гексане и проводили элюирование на всю длину столбика. В результате все три компонента разделялись. При простом элюировании 15 %-ным раствором этилацетата в гексане хорошего разделения не получалось. Позднее, в 1959 г., Вейкер [104] и Шталь [105] применили ступенчатое элюирование ТСХ.

Методика ступенчатого элюирования может быть самой разной. Можно вначале элюировать пробу менее полярным растворителем, а затем более полярным или наоборот. Разумеется, число растворителей может быть больше двух. Каунитц и сотр. [106] описали элюирование рядом растворов метанола в бензоле с постепенно увеличивающейся концентрацией метанола (от 0 до 5 %). При этом элюирование каждым следующим растворителем с большим процентом метанола авторы [106] проводили

на меньшую длину слоя. Можно, однако, действовать и противоположным образом: вначале элюируют на небольшую длину слоя и постепенно увеличивают длину пробега фронта растворителя [105, 107]. В некоторых случаях элюирование разными растворителями проводят на одно и то же расстояние [100, 108, 109].

Вейкер [104], Золлнер и Уолфром [110] и Боумен [111] несколько модифицировали метод ступенчатого элюирования. Последнее элюирование они проводили под углом 180° к первому, т. е. растворитель двигался в направлении, прямо противоположном первому проявлению. Так, при разделении липидов [104] хроматограмму вначале получали при элюировании на 30 мм смесью пропанола с аммиаком (2:1), затем в том же направлении на 100 мм смесью хлороформа с бензолом (3:1), а третье элюирование проводили в противоположном направлении на 40 мм четыреххлористым углеродом. Как и при многократном элюировании, после каждого элюирования растворителю давали испариться и после этого начинали элюирование другим растворителем. Разделяя липиды, Золлнер и Уолфром [110] помещали пробу в центр пластинки и дважды хроматографировали восходящим методом смесью петролейный эфир—бензол—этанол—эфир (100:20:10:4), далее пластинку поворачивали на 180° и элюировали смесью петролейный эфир—бутанол—ледяная уксусная кислота (90:6:2).

Как при многократном, так и при ступенчатом элюировании растворители удаляют с пластинки испарением. При этом (если только эту процедуру не проводят в закрытой камере путем продувания сухого газа) происходит частичная дезактивация адсорбента под действием влаги воздуха. Адсорбент может частично дезактивироваться также некоторыми растворителями. В этом смысле хроматография на незакрепленном слое имеет преимущество: адсорбент с неиспользованной части пластинки после первого элюирования легко удалить и заменить свежим [112, 113]. И наоборот, можно снять часть незакрепленного слоя, содержащую некоторые компоненты, и перенести на другую пластинку, а освободившийся участок первой пластинки покрыть слоем свежего адсорбента. Однако адсорбент, содержащий нужные компоненты, можно удалить также и с пластинки с закрепленным слоем и перенести на другую хроматографическую пластинку [114—116]. Адсорбент, содержащий пятно, удаляют с первой пластинки, впрессовывают на очищенный от адсорбента участок свежей пластинки. Иаконо и Ишикава [117] снимали адсорбент с первой пластинки, приготавливали из него суспензию и наносили в виде гладкого невысокого бугорка на поверхности слоя адсорбента другой пластинки.

Многозональное элюирование

Фурукава [118] первым доказал существование фронта второго растворителя при получении тонкослойных хроматограмм двухкомпонентной системой растворителей. Этот факт объясняется тем, что сродство к адсорбенту у одного из растворителей больше, чем у другого, и адсорбент селективно сорбирует более полярный растворитель. Фурукава обнаружил, что вещества, значения R_f которых лежат в зоне первого (верхнего) растворителя, начинают перемещаться по слою в тот момент, когда фронт растворителя достигнет пятна пробы. Однако те соединения, значения R_f которых лежат в нижней зоне, остаются неподвижными, пока до пятна пробы не дойдет фронт второго растворителя. При многокомпонентном элюенте образуется несколько фронтов растворителей. Этот эффект был использован Тизелиусом [119] во фронтальной колоночной хроматографии.

Описанное явление изучалось несколькими авторами [120—123]. Фреше и Дейдоун [122] проводили разделение на хроматографических пластинках, стеклянная подложка которых состояла из 16 полосок размером 1×15 см. Пластинки укладывали вплотную друг к другу на подложке из нержавеющей стали. После элюирования хроматограммы отдельные полоски быстро переносили в пробирки со стеклянными пробками и определяли состав растворителя в слое каждой полоски методом газовой хроматографии. Вайрисель и сотр. [121] исследовали влияние времени насыщения, недостаточной насыщенности, расслаивания и геометрии камеры на разделение группы фосфорорганических соединений.

Нидервизер и Бреннер [120] использовали явление «расслаивания» в методе разделения, названном ими «многозональным элюированием». В этом методе пробу наносят в виде серии пятен, расположенных по диагонали хроматографической пластинки. Если элюент многокомпонентный, пятна последовательно подвергаются воздействию ряда фронтов разных растворителей, причем порядок и продолжительность воздействия каждого растворителя зависит от положения пятна по отношению к точке погружения слоя в элюент. Результирующий эффект оказывается таким же, как при элюировании одной и той же пластинки многими разными системами растворителей.

Как показали Нидервизер и Бреннер, даже при простейшем случае «расслаивания» (при использовании двухкомпонентной системы растворителей) можно наблюдать ряд различных ситуаций. В первом примере, схематически изображенном на рис. 5.12, все соединения движутся в первой (α) зоне. В этом случае лучшее разделение достигается при применении совер-

шенно неполярного растворителя. Полярный же растворитель не участвует в разделении. Во втором примере (рис. 5.13) все компоненты движутся во второй (β) зоне, и кроме того, один компонент, перемещаемый фронтом β , движется также и в α -зоне. Лучшее отделение этого последнего соединения может быть достигнуто ступенчатым элюированием — вначале неполярным растворителем, а затем смесью растворителей. На рис. 5.14 показано, что происходит в том случае, когда в смеси присутствуют соединения, которые перемещаются в обеих (α и β) зонах, а на рис. 5.15 — когда все три указанные выше ситуации реализуются одновременно. В последнем случае точка оптимального разделения (обозначенная стрелкой) зависит от величины φ , которую авторы [120] определяют как

$$\varphi = \frac{\text{Расстояние от точки погружения до места нанесения пробы}}{\text{Расстояние от точки погружения до } \alpha\text{-фронта}}$$

Если смесь соединений перемещается β -растворителем, разделение можно осуществить с помощью менее полярных растворителей, а также с помощью более летучих полярных компонентов (например, эфира, метилхлорида) в насыщенной камере для разделения большого объема (в этих условиях «расслаивание» проявляется в меньшей степени).

Двумерная хроматография

Этот вариант ТСХ, широко применяемый в бумажной хроматографии, в сущности можно рассматривать как один из способов многократного или ступенчатого элюирования в двумерном пространстве. Однако двумерная хроматография более универсальна, чем оба эти метода. Первыми двумерное элюирование в ТСХ применили Кирхнер и сотр. [57]. Согласно разработанному ими методу, пробу наносят на угол квадратной хроматографической пластинки и элюируют обычным способом, после этого извлекают пластинку из камеры, дают растворителю испариться и помещают в другой растворитель таким образом, чтобы элюирование шло в направлении, перпендикулярном первому. Следует обратить внимание на то, чтобы линия пятен разделенных при первом элюировании веществ после поворота пластинки на 90° не оказалась ниже уровня второго элюента. Данный метод позволяет модифицировать адсорбент перед вторым элюированием. Изучая разделение мононенасыщенных жирных кислот, Бергельсон и сотр. [124] проводили первое элюирование на силикагеле, пропитанном додеканом, а перед вторым элюированием в перпендикулярном направлении дополнительно пропитывали слой адсорбента нитратом серебра. Йоханссон и Раймо [125] сочетали тонкослойную гель-фильтрацию на

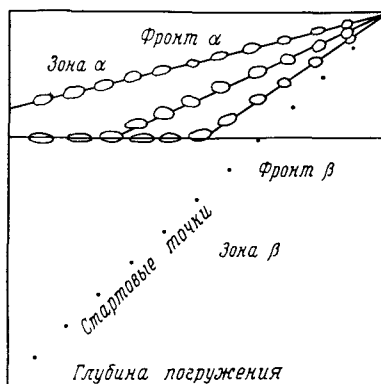


Рис 5.12 Многозональное разделение [20] (с разрешения авторов и Birkenhaeuser Verlag).

Все соединения перемещаются в зоне α . Более полярный растворитель не участвует в разделении. С помощью одного неполярного растворителя можно получить лучшую хроматограмму.

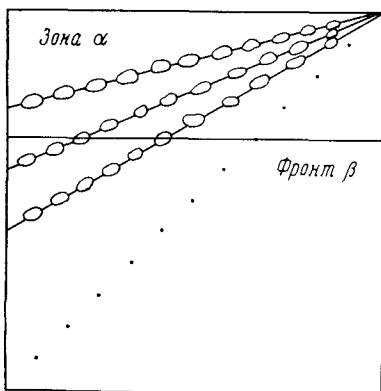


Рис. 5.14. Многозональное разделение [20] (с разрешения авторов и Birkenhaeuser Verlag). Все соединения перемещаются в обеих зонах (α и β).

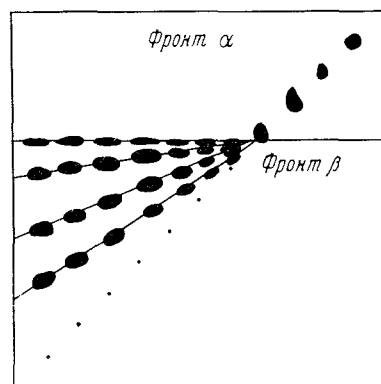


Рис 5.13 Многозональное разделение [120] (с разрешения авторов и Birkenhaeuser Verlag). Все соединения (более полярные, чем на рис 5.12) перемещаются в зоне β .

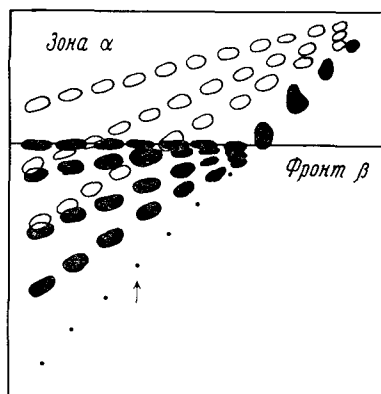


Рис 5.15. Многозональное разделение [120] (с разрешения авторов и Birkenhaeuser Verlag). Сочетание ситуаций, изображенных на рис 5.13 и 5.14.

сефадексе в одном направлении с тонкослойным электрофорезом в перпендикулярном направлении. Вергани и сотр. [126] пользовались этим же методом и нашли, что скорость перемещения некоторых высокомолекулярных белков при электрофорезе уменьшается. Поэтому после проведения гель-фильтрации на сефадексе G200 хроматограмму переносили на мембрану из ацетилованной целлюлозы и проводили электрофорез перпендикулярно направлению разделения на сефадексе. При сочетании гель-фильтрации с адсорбционной хроматографией Кальдерон и Боумен [127] рекомендуют вначале проводить адсорбционное хроматографирование, а потом гель-фильтрацию ввиду большей адсорбционной емкости адсорбента. В работах Кауфмана и Мейкуса [4, 128] описано разделение липидов путем сочетания обычной хроматографии и распределительной хроматографии с обращенной фазой. В одном направлении вначале проводят обычное хроматографирование на силикагеле, а после испарения растворителя свободную часть слоя пропитывают парафиновым маслом или ундеканом, растворенным в петролейном эфире, следя за тем, чтобы при пропитке растворитель не смыл пятна компонентов, расположенные вдоль края пластинки. После удаления избытка растворителя пластинку элюировали второй раз в направлении, перпендикулярном предыдущему. Хонегер [129] проводил в одном направлении электрофорез на забуференных адсорбентах, а в другом — обычное хроматографирование. Раймонд и сотр. [130, 131] разработали метод думерного электрофореза, в котором концентрации геля в двух направлениях была различной. Вначале проводили электрофорез при одной концентрации геля, затем тонкую полоску геля удаляли и переносили на другую пластинку, поверхность которой покрывали гелем с другой концентрацией. После затвердевания геля можно проводить электрофорез в другом направлении. Джимено де Оссо [132] описал трехмерное, а Поллак и сотр. [133] — четырехмерное элюирование одной пластинки (см. рис. 2.32, а, б и в). Цаппи и сотр. [134] наносили на пластинку со слоем целлюлозы на расстоянии 4 см от края слоя экстракты тиреоидных гормонов, содержащие мешающие липиды. При элюировании хлороформом липиды перемещались в верхнюю часть пластинки, а иодоаминокислоты оставались на месте. Примеси соскабливали с пластинки, поворачивали ее на 180° и обрабатывали смесью ацетон—0,1 н. уксусная кислота (2:8).

Эйнет [135] провел хроматографирование на силикагеле в одном направлении, после чего удалял лишний адсорбент с пластинки, оставляя только полоску вдоль одного края, содержащую пятна компонентов. После этого свободную часть пластинки покрывал оксидом алюминия, высушивал на воздухе и

проводил разделение в поперечном направлении. В работе Кирхнера и Флейнегана [136, 137] описана двумерная хроматография на составных слоях адсорбентов. В этом случае оба адсорбента наносили на пластинку до нанесения пробы. Вначале с помощью направляющих полосок вдоль края пластинки на-

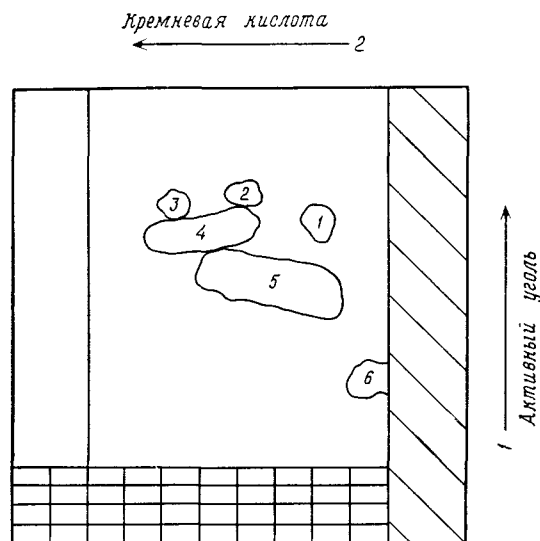


Рис. 5.16. Двумерное разделение некоторых кетонов на пластинке с двумя смежными слоями [136].

Первое разделение проводилось смесью бензол—эфир—уксусная кислота (82:9:9), второе — смесью бензол—эфир (85:15). Обнаруживающий реактив: раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н соляной кислоте. Диагональная штриховка — активный уголь с добавкой 10 % крахмала; сетчатая штриховка — участок, свободный от адсорбента; остальная часть пластинки содержит слой кремневой кислоты с добавкой 2,5 % крахмала; длина пути разделения 10 см.
1 — лактон Angelica; 2 — ацетофенон; 3 — 7-тридеканон; 4 — бромацетофенон; 5 — 2-метилциклогексанон; 6 — 2-оксиацетофенон.

сили полоску одного адсорбента, высушивали и покрывали остальную часть подложки другим адсорбентом. Часть второго адсорбента с одного края пластинки удаляли, чтобы он не мог соприкасаться с первым растворителем. Это делали с тем, чтобы избежать диффузии, поскольку растворитель по одному адсорбенту движется быстрее, чем по другому. Эффективность этой методики была показана на примере пластинки со смежными слоями активного угля и кремневой кислоты. Пробу наносили на узкую полоску активного угля и элюировали смесью бензол—эфир—уксусная кислота (82:9:9) в направлении вдоль слоя угля. После высушивания на воздухе пластинку элюировали в поперечном направлении 15 %-ным раствором эфира

в бензоле с тем, чтобы переместить разделяемые компоненты с угля на кремневую кислоту, где их можно будет увидеть (рис. 5.16). Аналогичный метод был использован для разделения бергамотового масла на комбинации слоев силиката магния и кремневой кислоты (рис. 5.17).

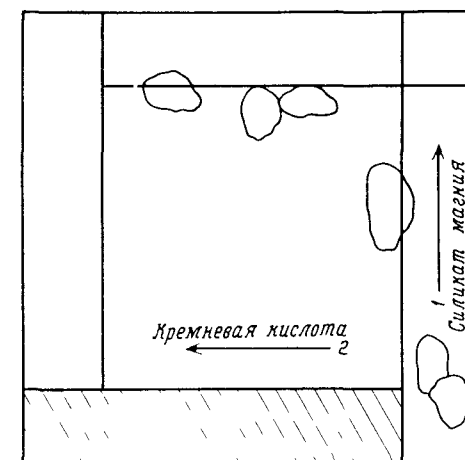


Рис. 5.17. Двумерное разделение бергамотового масла на пластинке со смежными слоями силиката магния и кремневой кислоты (с добавкой 2,5 % крахмала) [136].

Элюент — в обоих направлениях бензол; заштрихованная зона — участок пластинки, свободный от адсорбента.

Бергер и сотр. [138—140] описали прибор для одновременного нанесения на пластинку двух смежных слоев разных адсорбентов. Для этой цели в стандартный аппликатор вставляют пластиковую перегородку и в результате получают две отдельные камеры. Авторы использовали составные слои как для одномерной хроматографии с целью удаления мешающих компонентов, так и для двумерной хроматографии. В последнем случае целесообразно процарапать щель между слоями адсорбентов перед первым элюированием. Это позволяет предотвратить смещение пятен в сторону, если скорость движения растворителя по одному слою окажется больше, чем по другому, или если нужно избежать попадания растворителя на второй слой при первом элюировании, когда второй адсорбент удален с нижней части пластинки [136]. После первого разделения щель можно заполнить, впредвывая в нее сухой адсорбент.

Составные слои применимы также и в одномерной хроматографии. На таких слоях проводилась очистка пестицидов [141—

143]. Варади [144] использовал составной слой для того, чтобы перевести слой сильнокислой катионообменной смолы частично в Na^+ - и частично в Li^+ -форму.

Разумеется, ступенчатое и многократное элюирование можно сочетать и с двумерной хроматографией. Таким методом Сейбл-Эмплис и сотр. [145] удаляли некортикоидные соединения из экстрактов плазмы. Пробы наносили по средней линии пластинки. Некортикоидные соединения удаляли, проводя два последовательных элюирования смесью а) *n*-гексан — этилацетат (4:1) и б) этилацетат—циклогексан—толуол (10:10:1). После этого пятна мешающих соединений соскабливали с пластинки, поворачивали ее на 180° и с помощью бумажного фильтра через свободную часть пластинки подавали элюент на слой.

При двумерной хроматографии можно также переносить пятна компонентов с одной пластинки на другую, как это делают в ступенчатой хроматографии. Другой метод описан Памфри [146]. Он проводил элюирование в первом направлении на полоске шириной в 2 см, после чего высушивал эту полоску и прижимал ее с помощью зажима слоем вниз к пластинке размером 20×20 см и повторял элюирование уже в поперечном направлении. Для удовлетворительного разделения в этом случае необходим хороший контакт между слоями. Бонд [147] применил аналогичный принцип для разделения хроматографических слоев на пластиковой подложке.

Тонкослойная хроматография высокого разрешения (ВЭТСХ)

В этом методе адсорбентом служит тонкозернистый (60 Å) силикагель с очень узким распределением частиц по размерам. Такой силикагель обладает лучшими разделяющими и оптическими свойствами, чем обычные силикагели [72]. Однако на слоях адсорбента растворитель движется медленнее, поэтому, чтобы уменьшить длительность элюирования, обычно берут пластинки меньших размеров. Меньшая длина хроматограммы более чем компенсируется значительным улучшением разделения. Разделение по этому методу также ведут на меньших пробах, поскольку иначе пластинка перегружается; если проба превышает 10 мкг, достигнуть разделения не удастся. Чтобы диаметр наносимых пятен проб был минимальным (< 2 мм), можно наносить пробы либо из шприца фирмы Hamilton емкостью 1 мкл с микрометрическим винтом, либо из специального платино-придиевого капилляра (изготавливается фирмами Analtech и SAMAG). В остальном в этом методе применимы все описанные ранее приемы ТСХ. При проведении количест-

венного анализа обнаруживают разделенные соединения, опрыскивая пластинку детектирующим реактивом из автоматического пульверизатора (фирмы Anton Paar), поскольку при ручном опрыскивании реактив наносится недостаточно равномерно [147a]. Этому методу посвящена специальная монография [71].

Центрифужная хроматография

Этот метод, в котором движение потока растворителя по слою адсорбента ускоряется под действием центробежной силы, впервые был применен в бумажной хроматографии [148, 149]. Херндон и сотр. [150] впервые описали применение этого метода для разделения на слоях таких адсорбентов, как кремневая кислота, крахмал и оксид алюминия, нанесенных на бумажную подложку. Корзун и Броуди [151] применили метод в тонкослойной хроматографии. Они наносили слой оксида алюминия или силикагеля с добавкой алебаstra на круглые пластинки из стекла или алюминия. В центре пластинок было сделано отверстие, позволяющее закрепить пластинки на центрифуге. Пробы наносили на расстоянии 2,5 см от центрального отверстия и подавали растворитель с умеренной скоростью, чтобы избежать перегрузки. Скорость вращения центрифуги составляла 500—700 об/мин. Таким образом удавалось сократить длительность разделения с 35 до примерно 10 мин. Росмус и сотр. [152] разделяли таким методом красители и 2,4-динитрофенилгидразоны. Эффонсо [153] использовал пластинки с алебастром, а Лепуавр [154] применял разные адсорбенты на пластинках диаметром до 40 см. Обзор работ по центрифужной хроматографии опубликован Дейлом и сотр. [155].

Хроматография на клиновидных слоях

Маршалль и Митвер [156, 157] предложили модифицировать бумажную хроматографию таким образом, чтобы вначале проба перемещалась по узкой полоске бумаги, а затем могла распространяться по большей площади. При этом пятна превращались в узкие полосы, благодаря чему разделение улучшалось. Аналогичный эффект имеет место в радиальной хроматографии.

В ТСХ этот принцип первым применил Мотье [73, 158]. Фурукава [160] исследовал множество полосок разной формы, чтобы установить влияние формы на разделение. Хаусер [161], Прей и сотр. [162] и Бейзер [163] использовали простые полоски клиновидной формы и получили такие же результаты. Эти полоски изображены на рис. 5.18.

Эббот и Томсон [164, 165] предложили клиновидные полоски (слои) несколько иного типа. Эти авторы приготовили

пластинки со слоями переменной толщины, с тем чтобы слой был клиновидным не по ширине, а по толщине. Пробу наносили на толстый край слоя. В цитируемых работах таким образом проводили очистку пестицидных остатков. Бейзан и Джоел [166] применили аналогичный метод для разделения липидов.

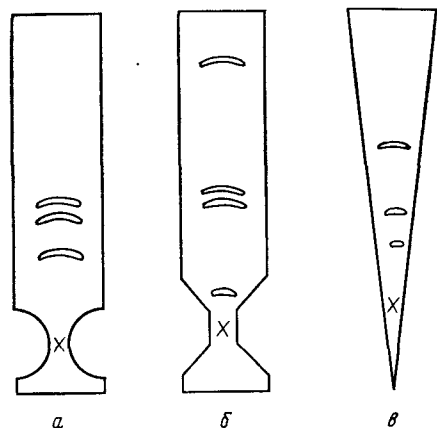


Рис. 5.18. Различные типы хроматографии на клиновидном слое. *a* — по Мотье [158]; *b* — по Пирбуму и Биксу [159]; *c* — по Хаузеру [161].

Градиентные методы

Существует ряд градиентных методов, которые приемлемы и в ТСХ. Вероятно, наиболее известен метод градиентного элюирования, широко применяемый в колоночной хроматографии.

При градиентном элюировании состав элюента меняют непрерывно или ступенчато. Уиланд и Детермен [167] сконструировали для градиентного элюирования специальную камеру, позволяющую менять состав растворителя непрерывно (рис. 5.19). Раствор гомогенизуют перемешиванием магнитной мешалкой, а полоска фильтровальной бумаги, закрепленная на нижнем (погруженном в растворитель) краю пластинки с помощью резиновой ленты, предотвращает механическое размывание слоя при перемешивании. Растворитель добавляют в камеру с помощью бюретки или дозирующего насоса. Объем поддерживается постоянным, так как избыток жидкости выливается. С помощью этой установки можно постепенно увеличивать силу буферного раствора [167, 168], повышать полярность растворителя [169—171], менять pH раствора, а также проводить направленное изменение любой другой системы, в которой

желательно менять состав растворителя-элюента в процессе разделения.

Луццато и Окое [172] и Стрикленд [173] использовали фитиль для подачи растворителя меняющегося состава на тонкослойную пластинку при нисходящем или горизонтальном элюировании. Растворители смешивали в специальном сосуде, снабженном магнитной мешалкой. Для получения смеси растворителей переменной состава предложено много различных

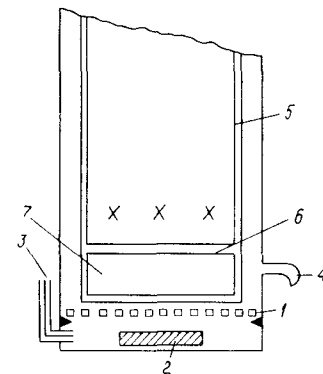


Рис. 5.19. Разрез нижней части камеры для тонкослойной хроматографии с применением градиентного элюирования [167] (с разрешения авторов и Vorkenhaeuser Verlag).

1 — пластинка из пористого стекла; 2 — стержень магнитной мешалки; 3 — ввод элюента; 4 — вывод избыточного элюента; 5 — хроматографическая пластинка (5×20 см); 6 — резиновая лента; 7 — бумажная полоска (1,5×5 см), предотвращающая смыв нижней части слоя.

устройств, в том числе приборы Хегенауэра и сотр. [174], Петерсона и Роуланда [175], Петерсона и Собера [176] и Нидервизера и Хонегера [177]. Нидервизер и Хонегер [123, 177] сконструировали несколько приспособлений для подачи смеси растворителей переменной состава на хроматографическую пластинку, особенно удобных в сочетании с прибором Бреннера—Нидервизера для непрерывного проявления (Б—Н-камерой) или с сэндвичевыми пластинками.

Авторы работы [178] проводили градиентное элюирование, перенося хроматографическую пластинку без высушивания из одной камеры в другую (камеры содержали различные смеси растворителей).

Тар [179] разработал единственный в своем роде простой метод градиентного элюирования, правда имеющий некоторые ограничения. Кювету, заполненную относительно полярным растворителем, помещают в обычную камеру, насыщенную парами

летучего неполярного растворителя. Хроматографическую пластинку погружают в полярный растворитель и начинают элюирование. При движении по пластинке полярный растворитель испаряется и постепенно заменяется неполярным растворителем, т. е. происходит градиентное элюирование. В работе Тара приведена таблица ряда полярных растворителей, пригодных для этого метода. Предложенный Таром метод похож на градиентное проточное хроматографирование, описанное Нидервизером [180] приблизительно в это же время. Нидервизер помещал смесь растворителей в кювету вертикальной сэндвичевой системы. Обратную сторону хроматографической пластинки нагревали электрической плиткой, испаряющийся растворитель конденсировался на покровной плате и стекал снова в кювету. Покровную пластинку можно было также охлаждать с помощью специального холодильника. Разделяемые соединения при этом концентрировались в виде горизонтальных линий, положение которых не зависело от места нанесения пробы и площади исходного пятна. В этом случае давление паров более полярного соединения также должно быть наибольшим, а давление паров неполярного соединения наименьшим. Турина и сотр. [181] в описанном ими методе также применяли нагревание хроматографических пластинок. Эти авторы пользовались обычной камерой для разделения. В тех случаях, когда требовалось очень хорошее отделение примесных компонентов от основных (когда отношение концентраций этих компонентов достигало $1:10^{-5}$), между нагретой пластинкой и хроматографической пластинкой помещали еще одну специальную пластинку, а температуру нагретой пластинки увеличивали [182]. Дополнительная пластинка представляла собой асбестовую полосу, соединенную с металлической полоской. Зона высокого разрешения находилась в месте соприкосновения металла и асбеста.

Выше в разделе, посвященном приготовлению слоев адсорбента, упоминалось о градиентных слоях. Такие слои могут содержать постепенно меняющуюся по составу смесь двух адсорбентов, причем концентрация их меняется от 100 % компонента А на одном краю пластинки и до 100 % компонента Б на другом краю пластинки. Можно создать по слою также градиент активности адсорбента, меняя его влажность [183, 184], состав пропитки, рН или содержание комплексообразователя. Эти типы градиентов весьма полезны для отыскания наиболее эффективных адсорбентов для разделения заданной смеси.

В 1965 г. Даллас [185] исследовал влияние адсорбции паров растворителя в проявительной камере на значения R_f , а Принцлер и Тоухмен [186] обратили внимание на тот факт, что при разделении следует учитывать изменение состава неподвижной фазы, обусловленное адсорбцией паров растворителя. Де Зеув

[187, 188] и Ван Дийк и сотр. [189] исследовали влияние на разделение предварительной обработки адсорбента парами различных растворителей. Де Зеув разработал прибор и методику хроматографирования в тонком слое с программированием состава паровой фазы. В этом методе слой адсорбента по частям подвергается воздействию паров различных растворителей, в результате чего образуется градиентный слой [190, 191]. Приборы для программирования состава паровой фазы выпускают фирмы Desaga и SAMAG.

Другой вид градиентной хроматографии — хроматография на слое переменной толщины, т. е. на клиновидном слое. Этот метод предназначен для очистки проб [164, 165] или для нанесения больших проб на стартовую линию, с тем чтобы можно было обнаружить примеси в относительно больших количествах экстракта [166]. Эббот и Томсон [165] получали клиновидные слои адсорбента с помощью модифицированного распределителя слоя. Такие слои можно получить с помощью прибора «Хромфлекс» фирмы Kontes. Он представляет собой стеклянную пластинку клиновидной формы, снабженную по краям бортиками для удобства нанесения суспензии.

Еще один возможный вид градиента — температурный градиент. Температура в процессе разделения может как повышаться, так и понижаться [192—197]. Кауфмен и сотр. [197] сумели разделить смесь близких по свойствам липидов одного класса методом ТСХ с обращенной фазой при низких температурах и программировании температуры. Блезиус и сотр. [198] сконструировали прибор для проведения высоковольтного ионофореза при градиенте температуры. Для охлаждения и создания градиента температуры были использованы элементы Пельтье. Этим методом удалось добиться лучшего разделения, чем при работе в изотермическом режиме.

В работах [199—202] описано приготовление полиакриламидного геля с градиентом по размеру пор, предназначенного для молекулярно-ситового электрофореза. Марголис и Ригли [203] также приготавливали полиакриламидный гель с градиентом по размеру пор, в котором содержание поперечных связей повышалось с увеличением концентрации геля. Благодаря этому устранялось влияние различия зарядов при определении молекулярных масс компонентов.

Распределительная хроматография

Распределительная хроматография приобрела известность после ее применения в бумажном варианте, предложенном Мартином и Синджем [204]. В распределительной хроматографии жидкая фаза адсорбируется на носителе, в результате чего

в процессе разделения хроматограммы разделяемые компоненты распределяются между неподвижной жидкой фазой и движущимся растворителем. Чтобы неподвижная фаза не менялась, элюент обычно насыщают этой жидкой фазой.

При работе с тонкими слоями целлюлозы можно использовать те же растворители и те же методики, что и в бумажной хроматографии. Однако в качестве носителей неподвижной жидкой фазы в тонкослойной распределительной хроматографии могут применяться и другие материалы, например силикагель [205—211] и кизельгур [205, 212—215], характеризующиеся малой адсорбционной активностью.

Если носитель пропитан неполярным растворителем, то такое разделение называют «хроматографией с обращенной фазой». Подробное описание методов прспитки приведено в разд. 7 гл. III. Помимо целлюлозы, силикагеля и кизельгура в качестве носителей неподвижной жидкой фазы в ТСХ с обращенной фазой использовались также оксид алюминия [216], гипс [217, 218], крахмал [219, 220] и карбонат цинка [43].

Тонкослойная гель-хроматография

При гель-фильтрации разделение происходит по размерам молекул. Чаще всего для этой цели используются декстрановые гели (сефадексы) с различной степенью сшивки. От числа поперечных связей зависит размер пор в геле. (Приготовление хроматографических пластинок с сефадексом описано в разд. 6 гл. III.) Недавно Хьертен [221] разработал для гель-фильтрации сшитые полиакриламидные гели, и в настоящее время ряд марок полиакриламидных шариков с различной пористостью выпускает фирма Bio-Rad Laboratories. Молекулярно-ситовые эффекты (гель-фильтрация) наблюдаются также и при хроматографировании на силикагелях, особенно если предварительно смочить адсорбент элюентом [222—225].

Пробу наносят на пластинку, установленную горизонтально, после чего устанавливают пластинку под углом 10—20° к горизонтали и элюируют нисходящим потоком растворителя, регулируя его скорость углом наклона. Можно также использовать сэндвичевые пластинки или специальные держатели для пластинок фирмы Pharmacia. Яворек [226] и Джеймс и сотр. [227] приводят подробные схемы установок для гель-фильтрации, а также устройства для измерения оптической плотности разделенных фракций. При количественных исследованиях принимают специальные меры для получения однородных слоев адсорбента. Возможно и горизонтальное элюирование; в этом случае скорость движения растворителя регулируют, поднимая или опуская сосуд, из которого он подается. Согласно данным работы

[228], разделение методом круговой хроматографии происходит быстрее, чем разделение обычным линейным методом.

Для хроматографирования обычно используют водные растворы. Однако в работах [229, 230] описано разделение на метилированном сефадексе с применением полярных органических растворителей. Слегт и Сипмен [231] применили этот метод для тонкослойной гель-фильтрации. Гель метилировали диметилсульфатом в водном растворе гидроксида натрия. При работе на приборе фирмы Pharmacia органические растворители использовать нельзя, поскольку он изготовлен из пластика.

Слой сефадекса при опрыскивании детектирующими реактивами проявляют тенденцию к разрыхлению. Поэтому Померанц [232] для получения более прочных слоев после разделения осторожно опрыскивал пластинки 1,5 %-ной водной суспензией агарового геля, который предварительно нагревали до 55°C и затем охлаждали.

Выше (в разд. 6 гл. III) мы уже упоминали об использовании гель-фильтрации для определения молекулярных масс разделенных компонентов. Преимущество тонкослойной гель-фильтрации состоит в возможности работы с очень малыми (менее 0,1 мг) пробами. В то же время по точности определения молекулярных масс этот метод лишь немного уступает колоночной гель-фильтрации [233]. При гель-хроматографии белков результаты определения молекулярных масс могут оказаться ошибочными, если исследуемые белки по форме существенно отличаются от тех, которые используются для калибровки. Однако этих ошибок можно избежать, если растворить белки в 5—8 М растворе солянокислого гуанидина [234], так как в этом случае все они приобретают конфигурацию пространственной спирали. Клаус и сотр. [235] и Хейнц и Прош [236] воспользовались этим приемом при определении методом тонкослойной гель-фильтрации молекулярных масс полипептидов. Для той же цели применялись также растворы мочевины и додецилсульфата [237].

Методом гель-фильтрации исследовались также ферменты [238—240], красители [241, 242], глобулины [243, 244] и белки [245—248]. Отока [249] рассмотрел теоретические аспекты исследований молекулярно-массового распределения фракций полимеров на силикагеле. Общие сведения о гель-фильтрации можно найти также в работах Детермана [250], Виланда и Детермана [251] и Уильямса [252]*.

* Вопросы анализа полимеров хроматографическим методом, в том числе и методом ТСХ, подробно изложены в монографии Б. Г. Бельского, Л. З. Виленчика (Хроматография полимеров.— М.: Химия, 1978).— *Прим. ред.*

Тонкослойный электрофорез

Этот метод впервые использован в 1946 г. Консен и сотр. [253] первыми применили этот метод. Они разделяли аминокислоты и пептиды на слоях агара и силикагеля толщиной 1,4 мм.

Уим и Рейб [254] прибегли к тонкослойному электрофорезу вторыми. Они провели разделение на слое агарового геля толщиной 2 мм, нанесенном на стеклянную подложку. Уим [255], Боур [256, 257] и Ремси [258] рассмотрели преимущества тонкослойного электрофореза по сравнению с обычными методами и пришли к следующим выводам: 1) в тонкослойном электрофорезе допустима более эффективная система охлаждения, что позволяет уменьшить температурные эффекты; 2) чувствительность обнаружения некоторых соединений в тонкослойном электрофорезе выше, чем в колоночном; 3) отпадает необходимость по окончании электрофореза делать срезы геля. В работах Ковальчука [259—268] рассматриваются различные факторы (рН, температура, концентрация), которые могут меняться в процессе электрофореза и тем самым влиять на ход процесса, и обсуждаются способы уменьшения этих изменений.

Кроме обычных стеклянных подложек для нанесения тонкого слоя геля приемлем также ряд других материалов. Подходящей подложкой для геля оказалась листовая целлюлоза [269, 270]. Боур [256, 257] считает, что для этой цели идеально подходят целлюлозные коробки типа 80F (Union Carbide, Film Packing Division). Эриксен [271] применял в качестве подложек пластиковые кюветы, а Вейнер и Зак [272] — стеклянную бумагу, покрытую пленкой тефлона. Если предполагалось проводить денситометрию электрофореграмм в УФ-свете, то авторы последней работы использовали в качестве подложек кварцевые пластинки. Той же цели могут служить и шлифованные стеклянные пластинки [273, 274], поскольку адгезия геля к ним выше и он меньше повреждается при опрыскивании и промывке. Зак и сотр. [275] указывают, что подложка в электрофорезе на гелях — важный фактор, на который долгое время не обращали внимания. Так, пергаментная бумага растительного происхождения и бумага, покрытая тефлоновой пленкой, — хорошие подложки при разделении белков сыворотки и нуклеиновых оснований, однако попытка разделить адениновые нуклеотиды на агарозном геле с подложками из этих материалов к успеху не привела.

Агаровые слои применялись при электрофорезе белков [254, 255, 276—286], мукополисахаридов [287], фосфорорганических пестицидов [288], гемоглобина [289—291], компонентов нуклеи-

новых кислот [292], порфириновых пигментов [271], неорганических ионов [293] и вирусов [294]. В некоторых случаях, чтобы устранить помехи, вызванные присутствием сульфат-иона, разделение проводили на агаре, свободном от сульфата (агароза) [287, 294]. Методы разделения агара и агарозы и приготовления из них шаровидных гранул описаны в работах [295—297]. Агарозу выпускают фирмы Bio-Rad Laboratories и Pharmacia. Поурат и сотр. [298] и Лаас [299] показали, что свойства агара и агарозы можно улучшить, если шить их молекулы эпихлоргидрином. Еще лучших результатов можно достигнуть, если подвергнуть полученный продукт восстановлению. Полученные таким способом материалы отличаются от поставляемых фирмами готовых продуктов меньшим содержанием серы и пониженной адсорбционной активностью. Храмов и Галаев [300], чтобы очистить агаровый гель, предназначенный для микроэлектрофореза, обрабатывали его ЭДТА. Рассел и сотр. [294] для разделения вирусов по размерам частиц использовали ряд тонких слоев геля агарозы с постепенно возрастающей концентрацией. Однако оказалось, что при этом разделении нужно учитывать также подвижность молекул в электрическом поле.

Агарозу применяли при микроэлектрофорезе РНК [301] и микроиммуноэлектрофорезе [302, 303]. Костнер и Холасек [304] для повышения чувствительности электроиммунодиффузии и двумерного иммуноэлектрофореза вводили в гель агарозы 3—5 % декстрана Т70 или полиэтиленгликоля. Лаурелл [305] проводил количественное определение белков на геле агарозы, содержащем антители. Хазама и Ухикура [306] разделили методом ультрамикроразделения 1 мкг (10^{-12} г) белков в 1 мл сыворотки человека на смеси гелей агарозы и акриламида.

Слой агара можно получить из 1%-ного раствора агара в подходящем буфере. Равномерные слои получают, наливая определенное количество раствора на подложку, помещенную в подходящий сосуд. По окончании желатинизации избыток агара с краев пластинки удаляют.

В ряде работ описано разделение ферментов [258, 307—309] гемоглобина [257, 270, 310—314] и белков [270, 314—322] методом тонкослойного электрофореза на крахмальном геле.

Чтобы получить гель крахмала, берут 10 г гидролизованного крахмала фирмы Connaught Medical Laboratories, нагревают со 100 мл соответствующего буферного раствора на водяной бане при непрерывном перемешивании. Далее, как и при приготовлении агара, горячий раствор помещают в сосуд под уменьшенным давлением с тем, чтобы удалить из раствора воздух. После этого отмеренное количество раствора крахмала наливают на подложку и распределяют равномерным слоем.

В некоторых случаях для получения слоя геля нужной толщины использовали направляющие полоски. Боур [257], чтобы получить слой равномерной толщины, плотно прижимал к поверхности крахмала другую стеклянную пластинку. По бокам этой пластинки были укреплены металлические диски, обеспечивавшие нужный зазор между пластинками. После осторожного охлаждения геля покровную пластинку снимали и удаляли избыток геля по краям пластинки. Даамс [316] таким же способом приготавливал микропластинки с крахмальным гелем, только он покрывал их влажным целлофаном. После затвердевания

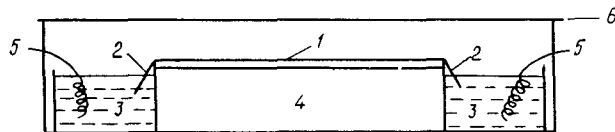


Рис 520. Схема устройства для электрофореза

1 — хроматографическая пластинка, 2 — полоски фильтровальной бумаги, соединяющие слой с электродными ячейками, 3 — электродные ячейки, 4 — подложка, 5 — электроды, 6 — крышка

геля покровную стеклянную пластинку осторожно удаляли, оставляя целлофан на месте, а затем снимали с геля и целлофан.

Разработано несколько методов нанесения пробы на пластинку с гелем агара или крахмала. В простейшем случае раствор пробы вводят капиллярной пипеткой в прорезь, сделанную в слое геля. Ремси [258] для этой цели удалял узкую (шириной 0,5 мм) полоску геля с помощью специального ножа, изготовленного из двух бритвенных лезвий. Пробу вводили в щель и заливали сверху расплавленным вазелином. Корнголд [321] проделывал в геле небольшие отверстия с помощью пипетки и затем отсасывал гель. Можно наносить пробы также с помощью полосок фильтровальной бумаги, которые накладывают на поверхность геля [257], вводят в прорези в геле или помещают в щели, сделанные заранее при формировании слоя геля. Уим [285] и Уим и Рейби [254] показали, что при работе с биологическими материалами можно просто помещать фрагмент исследуемой ткани на поверхность геля.

Для тонкослойного электрофореза пригодна большая часть устройств, предназначенных для электрофореза на бумаге. Общая схема такого устройства изображена на рис. 520. Обычно устройство для электрофореза на тонких слоях геля агара или крахмала содержит ячейку с забуференным гелем, помещенным между электродной камерой и хроматографическим слоем, однако при применении других хроматографических материалов

можно обойтись без такой соединительной ячейки. В этих случаях электродную камеру можно соединить с хроматографическим слоем фильтровальной бумагой или губкой, пропитанной буферным раствором. Бернс и Тернер [322a] применяли для этой цели полоски из мираклоза (фирма Calbiochem), вставленные в промытую диализную трубку. Трубку изгибали таким образом, чтобы миракрос не соприкасался непосредственно со слоем. Уим устанавливал покрытие агаром пластинки слоем

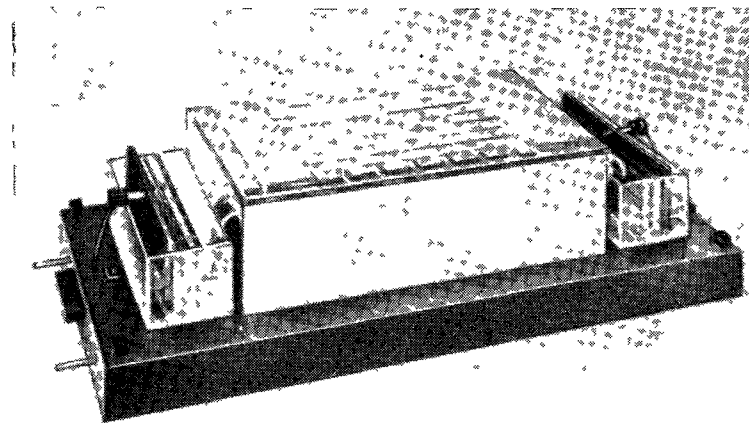


Рис 521. Прибор для тонкослойного электрофореза с водяным охлаждением пластинки фирмы Warner Chilcott Laboratories (с разрешения фирмы)

вниз таким образом, что слой соприкасался с агаровыми мостиками, а последние соприкасались с электролитом в электролитических ячейках.

Описано множество приспособлений для тонкослойного электрофореза. Здесь мы рассмотрим лишь наиболее типичные из них. Применяются как вертикальные [323—326], так и горизонтальные [327—330] устройства, которые существенно различны по конструкции. Обычно последние конструктивно проще.

Чтобы избежать повышения температуры в процессе электрофореза, хроматографическую пластинку можно охлаждать петролейным эфиром. Хонегер [129] помещал пластинки для ионофореза на охлаждаемую водой поверхность. Этот метод охлаждения наиболее часто применяется при электрофорезе. Устройства, в которых пластинки охлаждаются таким способом, выпускают фирмы CAMAG, Pharmacia, K. Marggraf, Research Specialities, Gelman, Desaga, Shandon, Turner, Analtech, E-C Apparatus Corp. и Warner-Chilcott. Прибор последней фирмы изображен на рис. 5.21.

Реймонд [322] разработал прибор, пригодный как для горизонтального, так и для вертикального электрофореза. Вертикальный электрофорез целесообразен лишь в том случае, если используемый гель непроницаем для жидкости, в противном случае трудно избежать перетекания электролита из верхней электродной ячейки в нижнюю. В упомянутом приборе слой геля толщиной 3 мм заключен между двумя параллельными пластинками, охлаждаемыми водой. По окончании разделения пластинки можно удалить, чтобы извлечь гель. При двухстороннем охлаждении прибор работает без заметного повышения температуры слоя при напряжении свыше 500 В и токе 200 мА. Этот прибор выпускает фирма E-C Apparatus Corp.

Поскольку сопротивление цепи в процессе электрофореза меняется, Шеффер и Джонсон [331] сконструировали источник питания, обеспечивающий постоянную силу тока даже при изменении сопротивления нагрузки.

Тонкослойные пластинки с силикагелем, предназначенные для электрофореза, можно готовить обычным способом. Для приготовления суспензии используют либо воду, либо подходящий буферный раствор. Высушенный слой можно насытить водой, если при приготовлении суспензии применялся буферный раствор, или, наоборот, буферным раствором, если для нанесения слоя использовалась водная суспензия. Контакт между слоем и электролитическими ячейками осуществляется посредством полосок фильтровальной бумаги, насыщенных тем же буферным раствором, что и слой силикагеля. Пастушка и Тринк [332] готовили тонкослойные пластинки несколько иным методом. Полоски фильтровальной бумаги приклеивали к двум краям обезжиренных стеклянных пластинок, причем клей наносили всего в нескольких точках, чтобы он не препятствовал прониканию электролита в бумагу. Бумага должна была заходить на край пластинки приблизительно на 10 мм. На другом конце бумажной полоски, погружаемой в электролит, делали многочисленные параллельные надрезы, чтобы улучшить капиллярность. После такой подготовки на пластинки наносили слой адсорбента.

Методом тонкослойного электрофореза на силикагеле разделены аминокислоты [129, 253, 333], пищевые красители, изготовленные из каменноугольных смол [334, 335], амины [129, 333], неорганические ионы [336, 337], нафтолы [333], фенолы [332], фенолкарбоновые кислоты [332], алкалоиды [338], пептиды [253, 339, 340] и углеводы [341].

Реймонд и Вейнтрауб [342] первыми применили полиакриламидный гель в качестве среды для тонкослойного электрофореза. Этот гель получают в результате полимеризации смеси акриламида с N,N-метилена-бис-акриламидом в буферных рас-

творах. (Реакционную смесь необходимо защищать от атмосферного кислорода.) При этом образуется прозрачный упругий нерастворимый гель, пригодный для электрофореза. Процесс идет без нагревания. В процессе полимеризации в геле образуются поперечные связи. Гели можно получать в присутствии различных буферных растворов, поэтому они пригодны к употреблению сразу после затвердевания. Смеси органических мономеров для приготовления геля выпускают фирмы American Cyanamid (цианам-41) и E-C Apparatus Corp. (Очистка материалов и приготовление геля описаны также в разделе, посвященном изоэлектрической фокусировке.)

На тонких слоях акриламидных гелей были разделены белки [130, 131, 322, 343], ферменты [344] и глобулины [345, 346].

Подвижность молекул с разной молекулярной массой в гелях крахмала или акриламида можно варьировать, меняя концентрацию гелей. Этот эффект выражен настолько сильно, что, меняя концентрацию геля крахмала, можно даже изменить порядок движения белков по этому гелю [347]. Орнстейн [348] показал, что, меняя концентрацию полиакриламида, можно изменить размер пор. Реймонд и Оурел [130] и Реймонд и Накамиши [131] использовали этот эффект в двумерной хроматографии (см. разд. 5а, гл. V).

Сефадекс выполнял роль среды при разделении белков [125, 349—351]. Ферменты, которые нельзя разделить методом электрофореза на бумаге или тонких слоях крахмала без потери их активности, можно выделить без потери активности после электрофореза на сефадексе [349]. Йоханссон и Реймо [125] и Фазелла и сотр. [350] использовали сефадекс для двумерного тонкослойного разделения, в котором в одном направлении проводили тонкослойную гель-фильтрацию, а в другом — электрофорез. При приготовлении тонких слоев сефадекса сухой порошок смешивают с избытком подходящего буферного раствора (1:7,5) и оставляют на 24 ч. После этого удаляют избыток жидкости, полученный гель наносят на стеклянную пластинку и выравнивают слой стеклянным прутком, перемещая его по направляющим полоскам. Чтобы предотвратить потерю влаги в процессе электрофореза, слой геля можно покрыть стеклянной пластинкой.

Вендрили и сотр. [351] повышали твердость слоев сефадекса, вводя в них агарозу.

На тонких слоях целлюлозы разделяли нуклеозиды [352, 353], кислоты [354, 355], алкалоиды [356], пептиды [357] и аминокислоты [358]. Результаты этих разделений сравнимы с результатами разделений, проведенных методом электрофо-

реза на бумаге. Применялись также слои из смеси целлюлозы с силикагелем [359, 360].

Методом тонкослойного электрофореза на кизельгуре разделяли пищевые красители, полученные из каменноугольных смол [333, 334], амины и аминокислоты [129] и неорганические ионы [335].

На оксиде алюминия тем же методом разделяли пищевые красители [334], белки [361] и амины и аминокислоты [129] и неорганические ионы [335].

В качестве среды для тонкослойного электрофореза использовался также алебастр [362, 363].

Тонкослойный электрофорез можно применять и в двумерном варианте разделения. Можно, например, проводить разделение на гелях с различной концентрацией [364]. В этом случае на пластинку либо сразу наносят слои геля с разной концентрацией, либо по окончании разделения в одном направлении вырезают полоску геля, содержащую исследуемые компоненты, и вводят ее в слой с другой концентрацией геля [365, 366]. Возможны также и другие комбинации, например разделение на агаре в одном направлении и на крахмальном геле в другом [367]. При разделении рибосомных белков проводили электрофорез в одном направлении в щелочном буферном растворе, а в другом направлении в кислотном буферном растворе [368, 369]. Для разделения белков пригоден также двумерный иммуноэлектрофорез [370, 371]. В этом случае второе разделение проводят на геле, содержащем антисыворотку.

Изоэлектрическая фокусировка

В 1912 г. Икеда и Судзуки [372] первыми выделили глутаминовую кислоту методом электролиза, однако принципы, на которых основан метод изоэлектрической фокусировки, впервые сформулировали Уильямс и Уотермен [373]. Метод приобрел практическое значение после опубликования работ Вестерберга и Свенсона [374, 375], в которых впервые были описаны амфолиты, пригодные для получения градиента pH.

Этот метод предназначен для анализа и исследования ферментов, гормонов и других амфолитов, представляющих интерес для биологов. Разделение соединений основано на различии их изоэлектрических точек. Метод можно определить как электрофорез на слое с градиентом pH. Амфолиты перемещаются по такому слою до тех пор, пока не достигнут такого места, где pH равен их изоэлектрической точке. В этом месте они концентрируются в виде резко очерченной зоны. Следовательно, таким образом можно не только разделить эти соединения, но и определить одновременно их изоэлектрические точки.

Этим методом разделяются вещества, которые не удается разделить методом электрофореза. Правда, верно и обратное: методом электрофореза иногда удается разделить соединения, не разделяющиеся электрической фокусировкой. Сочетание этих двух методов позволяет добиться прекрасных результатов при двумерном разделении.

Многие белки и другие амфолиты, которые ранее считались гомогенными, при исследовании методом изоэлектрической фокусировки оказались гетерогенными. Это объясняется тем, что данным методом можно добиться разделения, не осуществимого другими способами. В частности, можно разделить соединения, pI которых разнятся всего на 0,005 ед. pH [376]. Это возможно потому, что в то время, как при электрофорезе полосы постепенно размываются, в процессе изоэлектрического разделения полосы, наоборот, сужаются. По этой же причине рассматриваемым методом можно обнаружить малые примеси (до 0,2% [377]). Поэтому изоэлектрическая фокусировка — ценный метод окончательной очистки веществ.

Тонкослойную изоэлектрическую фокусировку можно проводить на установках для тонкослойного электрофореза, как вертикальных [323—326, 378, 379], так и горизонтальных [327—328, 380, 384].

Оуде и сотр. [385] разработали установку, в которой хроматографическую пластинку помещают вниз слоем геля на угольные электроды. При таком положении пластинки отпадает необходимость в электродных ячейках. Перед установкой пластинки в прибор катод смачивают 5%-ным (по объему) раствором этилендиамина, а анод — раствором фосфорной кислоты такой же концентрации. Работая с этим прибором, желателно использовать охлаждение, чтобы избежать чрезмерного повышения температуры в процессе разделения.

Эйвител и Эльсон [384] также описали устройство, в котором электролитические ячейки с буферными растворами соединяются со слоем геля без помощи мостиков из фильтровальной бумаги. В этом устройстве у пластинок со слоем геля загнутые края, которые погружаются в электродные камеры. Другое более простое приспособление, позволяющее избежать применения бумажных мостиков, разработали Либек и Раттер [382]. В этом устройстве гель на каждом краю слоя образует стенку электродной ячейки и благодаря этому контактирует с электродным раствором. В описанном устройстве используются покрытые гелем стеклянные пластинки, которые для охлаждения можно поместить на металлический блок, охлажденный до 4°C. (Если разделение проводится при низкой температуре, целесообразно покрыть поверхность геля листом пластика, чтобы предотвратить конденсацию влаги на его

поверхности.) Делинси и Радола [380] также использовали этот метод для охлаждения пластинок, но электроды они соединяли со слоем геля посредством фитилей из фильтровальной бумаги, пропитанных соответствующим буферным раствором. Кридль и сотр. [386] сконструировали камеру, охлаждаемую холодным воздухом.

При приготовлении пластинок с гелями существует ряд способов повышения адгезии геля к подложке. Прежде всего пластинки необходимо тщательно обезжирить спиртовым раствором гидроксида калия. Финлейзен и Крамбах [387] нашли, что адгезию геля к стеклянной поверхности можно повысить, если покрыть стекло слоем линейного полиакриламида с большой молекулярной массой (1 %-ным раствором гелямида 250 фирмы American Cyanamid). Они рекомендуют также заменить полностью или частично этилендиакрилат на N,N'-метилена-бис-акриламид, чтобы повысить адгезию к стеклу. Уэйда и Снелл [388], исходя из тех же соображений, проводили разделение на стеклянных пластинках, обработанных абразивом.

Для изоэлектрической фокусировки особенно широко используются полиакриламидные гели, обладающие малым электроосмосом. Конерт и сотр. [389] и Лорнинг [390] рекомендуют для улучшения профиля разделения готовить гель из предварительно очищенных реактивов. Эти авторы предварительно проводили двукратную перекристаллизацию акриламида и N,N'-метилена-бис-акриламида соответственно из ацетона и хлороформа.

Для разделения белков с молекулярной массой до 500 000 пригодны гели с содержанием 4 % акриламида [380]. Последние готовят из исходных растворов, которые могут храниться в темноте при 4°C в течение месяца. Исходные растворы готовят следующими методами:

1. *Каталитический раствор*: 1,12 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина и 11,2 мг рибофлавина растворяют в воде и доводят объем раствора до 100 мл.

2. *Раствор акриламида*: 0,64 г N,N'-метилена-бис-акриламида и 24 г акриламида растворяют в воде и доводят объем раствора до 100 мл.

Чтобы получить слой геля размером 20×10×1 мм, смешивают 6 мл раствора акриламида, 1,6 мл каталитического раствора и 0,7 мл 40 %-ного раствора амфолита-носителя (LKB Producter-AB) и доводят объем смеси до 36 мл. Бин и Реш [378] рекомендуют фильтровать акриламидные смеси непосредственно перед нанесением их на подложку, чтобы избежать попадания пылинок и волосков, которые могут мешать при фотографировании или количественной обработке полученных хроматограмм.

Ригетти и Драйсдейл [391] для улучшения консистенции геля добавляли к нему 5—10 % глицерина, а Бейтс и Дейо [392] повышали твердость и эластичность геля с помощью 3,5 %-ной добавки диметилсульфоксида.

Гели полимеризуются под действием света. Обычно для этого достаточно в течение 30 мин облучать пластинку двумя люминесцентными лампами дневного света мощностью до 40 Вт, установив их на расстоянии 15 см от пластинки.

Для разделения соединений с низкими молекулярными массами (менее 200 000) можно применять гели с более высокой (5—6 %) концентрацией [391]. И наоборот, для еще более высокомолекулярных (больше 500 000) соединений следует использовать более разбавленные гели. Флорини и сотр. [393] при анализе миозина применяли 2,6 %-ный гель. Однако если инициатором полимеризации служит рибофлавин, такие разбавленные гели получают слишком мягкими, и потому указанные авторы пользовались для этой цели 0,1 %-ным (масса/объем) раствором персульфата аммония. Гель следует отмыть от избытка персульфата, так как он может окислять легко окисляющиеся соединения. Робинсон [394] промывал гели в проточной дистиллированной воде в течение часа.

Амфолиты следует добавлять в промытые гели после того, как последние станут прозрачными. Робинсон нашел, что при нанесении амфолина на поверхность геля распределение получается неравномерным, что ведет к искажению градиента pH. Этого можно избежать, если предварительно полностью высушить гель и после этого вымочить его в 2 %-ном растворе амфолина.

Одно из преимуществ тонкослойной изоэлектрической фокусировки — малый расход амфолитов-носителей. Это очень важное преимущество, так как поставляемый фирмами амфолит (амфолин) очень дорог. Он представляет собой синтетическую смесь низкомолекулярных полиаминокарбоновых кислот неизвестного состава.

Ввиду высокой стоимости готового амфолина Виноградов и сотр. [395] исследовали возможность приготовления его в лаборатории и получили продукт, давший хорошие результаты в интервале pH от 4 до 8. Приготовлен этот амфолит был по следующей методике.

Реактивы. Акриловая кислота фирмы Aldrich, свежеперегнанная под вакуумом непосредственно перед использованием. Пентаэтиленгексамин (ПЭГА) фирмы Union Carbide, также перегнанная под вакуумом перед употреблением.

Методика. Акриловую кислоту в атмосфере азота добавляют по каплям при энергичном перемешивании в раствор

0,15 моля ПЭГА в 35 мл воды. Кислоту добавляют в течение 45—60 мин, пока соотношение азот : карбоксил в смеси не станет равным 2 : 1. После этого смесь нагревают до 70°C, перемешивают в течение 16—20 ч, охлаждают и разбавляют деионизованной водой до концентрации 40 % (мас. %).

Ландблед и сотр. [396] синтезировали более щелочные амфолиты (с верхним пределом рН 11,1). В более поздних работах Ригетти и сотр. [397, 398] рассматривается синтез и фракционирование амфолитов-носителей.

Концентрация амфолита-носителя имеет большое значение. Конерт и сотр. [389] исследовали некоторые факторы, влияющие на изоэлектрическую фокусировку. При содержании амфолитов порядка 1 % получить стабильный линейный градиент рН не удавалось и приходилось увеличивать концентрацию до 2 %. Эти авторы нашли также, что получить равномерный градиент рН можно, заменив гидроксид натрия и серную кислоту на аноде на 1 %-ную фосфорную кислоту, а на катоде — на 1 %-ный раствор этилендиамина. Применение более высоких концентраций амфолитов не улучшало разделение, а лишь уменьшало скорости перемещения белков.

При приготовлении тонких слоев полиакриламидных гелей их можно заливать в промежуток между двумя стеклянными пластинками, разделенными подходящей прокладкой. Боур [399] силанизировал одну из пластинок, чтобы избежать прилипания геля. Силанизирование проводилось одним из следующих двух методов:

1. Пластины в течение двух недель подвергали действию паров дихлорметилсилана в закрытом боксе, установленном в вытяжном шкафу, после чего тщательно промывали проточной водой.

2. Тщательно обезжиренные пластинки погружали в 2 %-ный раствор диметилдихлорсилана в четыреххлористом углероде, а потом давали растворителю улетучиться.

Чтобы избежать прилипания геля, можно также покрыть стеклянную пластинку тонкой пленкой пластика, затем удалить стекло и снять пластик, не повредив слоя геля.

Левин [400] рекомендует перед нанесением пробы подвергать гель с амфолином предварительной электрофокусировке, чтобы повысить воспроизводимость и добиться более определенной интерпретации результатов. Целесообразно в одном исследовании пользоваться амфолином из одной и той же партии, поскольку оказалось, что разные партии амфолина дают несколько различное разделение [401]. При разных концентрациях амфолина из одной партии градиент рН также получается различным [392].

Пробы необходимо предварительно обессоливать, чтобы предотвратить искажение градиента [402]. Наносить пробы можно несколькими различными способами. Их можно вводить в прорези в геле, подобно тому как это делается при электрофорезе, или в специальные углубления, сделанные при формировании слоя геля. Можно также просто медленно наносить растворы на поверхность геля или накладывать на поверхность геля полоски фильтровальной бумаги, пропитанные раствором пробы. Однако лучше применить для этого полоски ацетилюрованной целлюлозы [403], поскольку некоторые белки плохо элюируются с фильтровальной бумаги [404]. Преимущество тонкослойного метода разделения состоит в возможности нанести пробу как можно ближе к ее изоэлектрической точке. Это позволяет избежать денатурирования белка, чувствительного к изменению рН [394, 405, 406].

Следует опасаться возможности окисления легко окисляющихся соединений. Это особенно относится к белкам, содержащим SH-группу. Роль окислителя может играть кислород, образующийся на аноде, или персульфат, если он применялся в качестве катализатора при полимеризации геля, поскольку отмыть малые примеси этого соединения трудно. Попытки удалить персульфат путем предварительного электрофореза при рН 4,3 не дали положительных результатов [407, 408]. Влияние персульфата можно нейтрализовать, если добавить аскорбиновую кислоту в качестве восстановителя [410]. Окислители можно удалить также путем предварительного электрофореза с добавками дитионата [410], гидрохинона, цистеина или тиогликолята [408]. Возможность окисления можно уменьшить, если применить охлаждение геля. Авторы работы [394] показали, что охлаждение в щелочной области не только уменьшает вероятность окисления, но и улучшает разделение [394].

Джордан и Реймонд [411] предложили катализатор, содержащий аскорбиновую кислоту, 0,0025 % сульфата железа (II) и 0,03 % перекиси водорода. Для полимеризации полиакриламидных гелей в кислотных системах они рекомендуют 30 %-ный исходный раствор этого катализатора.

Не следует проводить процесс изоэлектрической фокусировки слишком долго, так как в этом случае градиент рН по слою постепенно сглаживается [387]. Это явление известно как «эффект плато». Сглаживание градиента происходит довольно медленно. Вестерберг [409] предложил два способа устранения «эффекта плато». Один из них заключается в том, что амфолиты-носители добавляют после полимеризации геля. В другом способе гемоглобин или другой хорошо заметный белок наносят на пластинку в двух местах — возле анода и возле катода. В тот момент, когда эти две полосы соединяются, данный

белок находится в точке его фокуса. Затем проводят разделение исследуемой пробы, увеличив длительность процесса на 25 %, чтобы обеспечить фокусировку тех соединений, которые движутся медленнее. Даже если амфолиты-носители добавлены после полимеризации, все же рекомендуется не проводить эксперимент слишком долго.

Иногда приходится встречаться с артефактами, но при тонкослойном разделении их можно легко распознать [412]. Для этого индивидуальные полосы фокусируют повторно, нанося пробы в различные точки геля.

Тонкослойная изоэлектрическая фокусировка дает очень хорошие результаты при разделении сложных смесей и при сравнительном исследовании серии проб в одних и тех же условиях.

По достижении равновесия нужно измерять рН в ряде близко лежащих точек по всей длине слоя геля. Это можно сделать двумя способами. Можно вырезать пробы геля (кружки диаметром 4 мм), вымочить каждую из них в 0,75 мл дистиллированной воды в течение 2 ч и после этого определить рН раствора [394]. При этом нельзя сильно разбавлять раствор, чтобы не превысить буферную емкость амфолита. Согласно рекомендации [380], объем воды не должен превышать семи объемов геля. При измерениях в щелочной области для уменьшения поглощения диоксида углерода следует использовать кипяченую воду или продувать растворы азотом. Чтобы электропроводность была достаточной, добавляют небольшие количества (10 ммоль) хлорида натрия. Другой, вероятно, более простой метод определения рН состоит в непосредственном его измерении путем наложения на поверхность геля плоского мембранного электрода (№ 14153 фирмы Instrumentation Laboratory, Inc. или LOT 403-30-M8 фирмы Ingold, A. G.).

Обычно большинство ферментов в процессе изоэлектрической фокусировки не теряют своей активности, исключение составляют лишь некоторые металлсодержащие ферменты. Их активность часто можно регенерировать, если добавить соответствующий ион металла в исследуемую смесь [413]. При обнаружении ферментов методами, применяемыми в гель-электрофорезе, может потребоваться добавка соответствующего буфера, чтобы нейтрализовать влияние амфолитов.

Изоэлектрическую фокусировку успешно применяли в микроанализе на слоях размером 8,2×8,2 или 9×9 см [399], а также на предметных стеклах размером 7,5×2,5 мм [403]. В этом плане могут представлять интерес методы микроэлектрофореза, описанные Даамсом [316].

Поскольку в методах изоэлектрической фокусировки и электрофореза разделение идет под действием разных факто-

ров, естественно сочетать эти два метода в двумерном разделении. Ригли и Шеферд [414] исследовали белок, извлеченный из отдельного зерна пшеницы, методом гель-электрофокусировки, затем вводили разделенные компоненты в слой 12 %-ного геля крахмала и проводили электрофорез в перпендикулярном направлении. Число глиадиновых компонентов, разделенных таким методом, было вдвое больше, чем при однократном разделении каждым из методов в отдельности. Хотя изоэлектрическая фокусировка первоначально предназначалась для разделения в трубке, а не в тонком слое, в принципе метод остается одним и тем же. Летнер [415] и Дейл и Летнер [416] применили описанный двумерный метод на акриламидном геле в клинических исследованиях для обнаружения различий в белках, входящих в состав нормальной и патологической сыворотки. Другим примером эффективности этого метода может служить работа Мeko и Стегемана [417], которым удалось распознать несколько видов растений, разделив извлеченные из клубней картофеля растворимые белки.

Следующий шаг в развитии данного метода — сочетание гель-электрофокусировки с градиентным гель-электрофорезом [418]. При этом разделение происходит как по величинам pI , так и по молекулярным массам. В этом случае могут представлять интерес методы, применяемые при приготовлении градиентных слоев для электрофореза [199—203, 370, 378].

Другой тип двумерного разделения с применением изоэлектрической фокусировки — это метод, в котором используется иммунодиффузия. В этом методе разделение проводят изоэлектрической фокусировкой на полиакриламидном геле, а затем фрагмент геля вводят в агарозу, содержащую антисыворотку. После этого проводят электрофорез в направлении, перпендикулярном первому разделению. Белки перемещаются в агарозу, и в ней появляются зоны миграции антигенов-антител [419].

Агарозные гели также испытывались в качестве среды для электрофокусировки [420—422], однако результаты оказались не вполне удовлетворительными, поскольку полученные градиенты рН были недостаточно стабильными из-за проявления довольно сильного электроосмоса.

Рейдола [423, 424] использовал для электрофокусировки гранулированные гели, например сефадекс G-75 «сверхтонкий» или G-200 «сверхтонкий» фирмы Pharmacia и биогель Р-60 (—400 меш) фирмы Bio-Rad Laboratories. Таким образом удавалось устранить молекулярно-ситовые эффекты, наблюдаемые при применении полиакриламидных гелей. На стеклянные пластинки наносили перечисленные гели в концентрации соответственно 7,5, 4 и 5,4 г/100 мл. Амфолитом-носителем служил амфолин, добавляемый в количестве 1 % (масса/объем),

а для стабилизации рН в щелочной области добавляли по 0,05—0,1 % аргинина и лизина. Далее гели высушивали до содержания воды около 80 %. В результате получались слои толщиной около 0,6 мм (при надлежащем высушивании по краям геля появлялись трещинки длиной 1—3 мм). Слой геля соединяли с соответствующими электродными растворами полосками из ацелированной целлюлозы, пропитанными растворами серной кислоты (0,2 М) и этилендиамина (0,4 М). В зоне рН от 4 до 5 иногда для достижения необходимой стабильности приходилось увеличивать концентрацию амфолина до 2 %. Этот метод легко приспособить для препаративного разделения граммowych количеств веществ путем простого увеличения толщины слоя. Разделение при этом не ухудшается.

Существует несколько методов обнаружения полос белков, разделенных методом изоэлектрической фокусировки. Однако при применении некоторых детектирующих реактивов необходимо перед опрыскиванием пластинки удалить из геля амфолиты-носители. Для этой цели Боур [399] промывал гели 6—7 раз растворами трихлоруксусной кислоты с постепенно уменьшающейся концентрацией (от 10 до 3 %), причем каждая промывка занимала 3 ч. После этого гели промывали смесью метанол—уксусная кислота—вода (45:9:46) до тех пор, пока рН геля не достигал величины 4,0. Это делалось с тем, чтобы избежать осаждения красителя при более низких рН. Хемфрейс [403] нашел, что при замене сульфосалициловой кислоты на трихлоруксусную гель разрушается меньше, и использовал для удаления амфолитов именно эту кислоту. Он проводил 4-кратную промывку геля в течение 48 ч. Хейес и Уэлнер [425] применяли для промывки смесь 5 %-ной трихлоруксусной и 5 %-ной сульфосалициловой кислот и затем воду.

Авторы работы [426] удаляли амфолин двумя различными методами. По одной из методик фракции подвергали диализу в подходящем буферном растворе. После этого проводили обратный диализ в растворе сульфата аммония для осаждения белка, который затем удаляли центрифугированием. В соответствии с другой методикой объем фракции вначале уменьшали с 3 до 2 мл ультрафильтрацией и после этого проводили диализ *in situ* в буферном растворе до тех пор, пока объем фракции не увеличивался в 2—3 раза. После этого объем снова уменьшали отгонкой при уменьшенном давлении до окончательного требуемого объема, величина которого зависела от концентрации белка.

Разработан ряд методов обнаружения белков, позволяющих обойтись без длительной процедуры предварительной промывки. Спенсер и Кинг [427] обрабатывали гели в течение ночи смесью 100 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты, 100 мл 10 %-ной

сульфосалициловой кислоты, 2 мл 1 %-ного раствора красителя Coomassie Blue и 40 мл метанола. Ригетти и Драйсдейл [376] модифицировали эту методику с тем, чтобы повысить чувствительность обнаружения и уменьшить фоновое окрашивание. Для этого они выдерживали гель 4 ч и более при комнатной температуре в растворе, содержащем 0,05 % красителя Coomassie Blue и 0,1 % сульфата меди (II) в смеси уксусная кислота—этанол—вода (2:5:13) и еще 4 ч в таком же растворе с уменьшенной (0,01 %) концентрацией красителя. После окрашивания избыток красителя удаляли промывкой смесью уксусная кислота—этанол—вода (1:1:8).

Фрейтер [412] опрыскивал пятна белков раствором, содержащим 0,05 % красителя Fast Acid Blue (С. I. 44035) и 0,05 % красителя Coomassie Violet R (С. I. 42650) в 5 %-ной уксусной кислоте. Для обесцвечивания фона гель обрабатывали 4—5 ч 5 %-ной уксусной кислотой. Поскольку белки окрашиваются по-разному, рекомендуется для достижения наилучших результатов испытать различные красители.

Ригетти и Драйсдейл [376] опубликовали обзор работ по изоэлектрической фокусировке на гелях. Кроме того, этой теме посвящена монография [427а], охватывающая ряд работ по тонкослойному разделению.

Автоматизированная тонкослойная хроматография

Первый полностью автоматический прибор для ТСХ был сконструирован в 1972 г. [428] и выпущен в продажу фирмой J. T. Baker. В этом приборе пробы автоматически наносились на адсорбент, покрывающий тонким слоем 35-миллиметровую майларовую пленку, намотанную на бобину. Пленка автоматически проходила последовательно процедуры разделения, высушивания, опрыскивания детектирующим реактивом и количественного измерения интенсивности пятен. Однако в настоящее время выпуск этого прибора прекращен, что, вероятно, объясняется техническими неполадками.

Другой автоматический прибор для ТСХ был выпущен фирмой Ligtner Instrument Co. В этом приборе пробы наносятся на отдельные тонкослойные хроматографические пластинки с помощью капилляра. Пробы помещаются в кассету, содержащую 100 иччек. После нанесения пробы капилляр промывается водой. Н: ту же пластинку могут наноситься и стандартные растворы. Пластинки с пробами перемещаются в камеры для разделения, которые в количестве 10 штук размещены на поворотном столике. Там пластинки проявляются в течение заданного времени, затем извлекаются из камер и высушиваются. После этого пластинки сканируются оптическим детектором

в одном из трех возможных режимов и результаты измерений регистрируются самописцем или цифропечатающим устройством. Прибор может измерять интенсивность флуоресценции, поглощение в видимой области или гашение флуоресценции. Опрыскивание детектирующим реактивом в этом приборе не предусмотрено. По данным фирмы, стандартное отклонение при анализах достигает 4—6 %.

Различные авторы автоматизировали и другие операции, применяемые в ТСХ. Фосслиен [429] разработал устройство для автоматической экстракции липидов и нанесения проб на пластинки. Снайдер и Смит [430] для облегчения работы с радиоактивными соединениями использовали систему, включающую автоматическое устройство для выскабливания пятен разделенных компонентов, коллектор с автоматическим спектрометром, снабженным жидким сцинтиллятором, блок обработки данных, перфоратор, вычислительную машину и электронное устройство для построения графиков. Соскабливающее устройство обеспечивало автоматическое удаление с пластинки пятен, отстоящих на 1, 2 или 5 мм от фронта растворителя. Фосслиен и сотр. [431] разработали управляемый компьютером соскабливатель, пригодный для последовательного извлечения выбранных пятен с любой точки поверхности стандартной пластинки. Кейзенг и сотр. [432] также сконструировали подобное полуавтоматическое устройство.

Рядом авторов разработаны приспособления для автоматического проявления. По-видимому, наиболее простое из них описано Измаилом и Харкнесом [433]. В этом приборе используется модифицированный будильник, который приводит в действие кран и обеспечивает добавление растворителя в проявительную камеру по истечении 4 ч, требуемых для приведения пластинок в равновесие с парами растворителя. Саундерс и Снайдер [434] описали устройство, в котором адсорбент был нанесен на поверхность цилиндра. Цилиндр в процессе разделения медленно вращался таким образом, чтобы расстояние между фронтом растворителя и его уровнем в резервуаре сохранялось неизменным. Халпаап и Боуш [435] аналогичным образом проводили элюирование на гибких хроматографических пластинках, которые приводились в движение роликами, размещенными в камере для разделения и над нею. В последних двух устройствах элюирование происходит с постоянной скоростью. Однако они мало пригодны для использования, если в разделяемой смеси наряду с веществами со средними и высокими значениями R_f присутствуют также медленно движущиеся компоненты. Шнек и сотр. [436] сконструировали автоматическую камеру для разделения, снабженную реле времени, фотоэлементом, различными реле и электромагнитными клапанами.

Процесс разделения в этом устройстве контролируется либо фотоэлементом, либо реле времени. Прибор пригоден как для одно-, так и для двумерной тонкослойной хроматографии. Конструкция его такова, что при переключении мотора меняется направление вращения и можно осуществить разделение в другом направлении. Возможно также многократное или ступенчатое разделение. Устройство прибора просто и остроумно. Филл [437] описал автоматическое устройство для разделения другой конструкции. В нем растворитель поступает в камеру для разделения под действием силы тяжести, а по окончании сливается и вновь подается в исходный резервуар с помощью насоса. С пластинки растворитель удаляется током азота или воздуха, и процесс разделения можно повторить несколько раз с применением одного и того же или разных растворителей, если нужно осуществить многократное или ступенчатое разделение. Имеется также приспособление для поворачивания пластинки при двумерной хроматографии. Устройство управляется автоматически с помощью 12-позиционной перфоленты и 20 цифровых селекторов.

Перри и сотр. [438, 439] разработали прибор для автоматического многократного разделения. На хроматографическую пластинку после нанесения пробы накладывают стеклянную пластинку, опирающуюся на разделительные прокладки. Получается сэндвичевая пластинка, которую погружают краем в резервуар с растворителем. Время разделения контролируется программным устройством. По истечении заданного промежутка времени растворитель с пластинки испаряется под действием нагревания, потока инертного газа или того и другого одновременно. В процессе испарения пластинка остается погруженной в резервуар с растворителем, защищенный экраном. По окончании испарения нагреватель выключается и разделение повторяется в течение несколько большего периода времени, после чего повторяется цикл испарения. Устройство позволяет в случае необходимости провести до 99 циклов разделения. С целью демонстрации возможностей этого прибора он был включен на непрерывную работу в течение 72 ч. За это время было выполнено 68 многократных разделений [440]. Описанный прибор выпускает фирма Regis Chemical Co. При повторных разделениях пятна компонентов концентрируются. Это объясняется тем, что при каждом последующем цикле разделения растворитель достигает вначале нижнего края пятна и успевает переместить его вверх прежде, чем увлажнится верхняя часть пятна. Описан также модифицированный вариант этой методики [439, 440]. Хроматографический слой покрывается экраном со щелью шириной 3 мм, расположенной над линией пятен разделяемых компонентов. При нагревании слоя растворитель прежде всего

испаряется из зоны, расположенной непосредственно под щелью. В результате растворитель с крайних частей слоя устремляется в центральную зону и двигает пятна разделенных компонентов

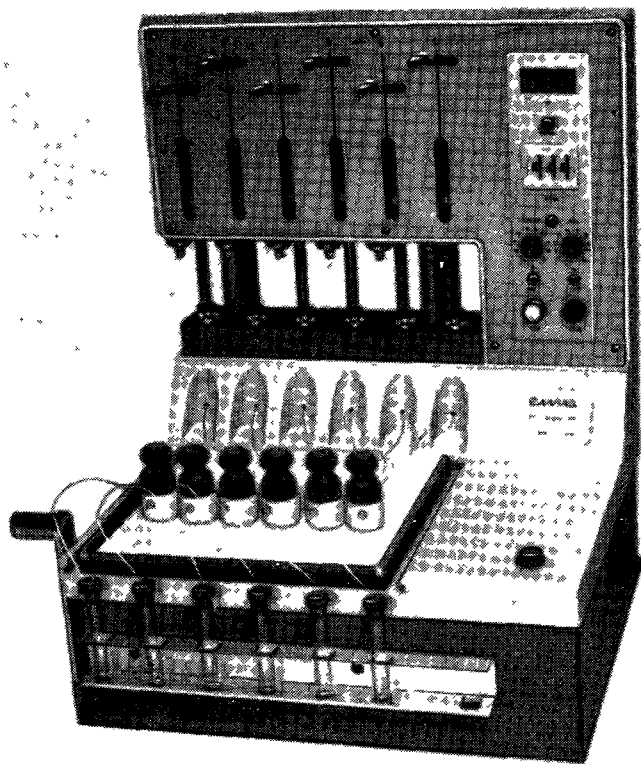


Рис. 5.22. Прибор для автоматического элюирования с тонкослойных хроматографических пластинок (с разрешения фирмы SAMAG).

к центру. Описанный метод называется «центрированным многократным разделением».

Автоматизация иного рода применена в приборе, сконструированном Фолком и Кремменом [441]: разделенные компоненты можно элюировать непосредственно с хроматографической пластинки, минуя операцию соскабливания пятен. Этот прибор, известный под названием «Элюхром» (рис. 5.22), выпускает фирма SAMAG. При работе на этом приборе вокруг пятен требуемых соединений делают ряд кольцевых царапин (до шести). Таким путем пятна изолируют от остальной части

слоя. После этого элюионные камеры закрепляют на изолированных пятнах и на пластинку возле каждой камеры постепенно подают с помощью шприца от 1 до 5 мл элюента. Скорость подачи растворителя можно менять в зависимости от скорости десорбции соединений. Элюат собирают с противоположной стороны камер в подходящий контейнер. По окончании элюирования сжатый воздухом сдувают остаток растворителя и высушивают слой. В течение всего 10 мин прибор можно настроить на автоматическое элюирование, и оператор может заниматься другими делами, тогда как соединения будут элюироваться автоматически. Согласно данным работы [442], полнота элюирования достигает 99 %.

Одной из форм автоматизации можно считать применение компьютеров, однако они используются в основном в количественном анализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Trappe W., *Biochem. Z.*, **305**, 150 (1940).
2. Wren J. J., *J. Chromatogr.*, **4**, 173 (1969).
3. Strain H. H., *Chromatographic Adsorption Analysis*, Interscience, New York, 1945, p. 66.
4. Kaufmann H. P., Makus Z., *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **62**, 1014 (1960).
5. Буленков Т. И., *Жур. анал. хим.*, **23**, 848 (1968).
6. Attaway J. A., Barabas L. J., Wolford R. W., *Anal. Chem.*, **37**, 1289 (1965).
7. Attaway J. A., *J. Chromatogr.*, **31**, 231 (1967).
8. Izmailov N. A., Schraiber M. S., *Farmatsiya (Sofia)*, **1938**, 1.
9. Crowe M. O'L., *Anal. Chem.*, **13**, 845 (1941).
10. Miller J. M., Kirchner J. G., *Anal. Chem.*, **24**, 1480 (1952).
11. Knight H. S., Groennings S., *Anal. Chem.*, **26**, 1549 (1954).
12. Massart D. L., *J. Chromatogr.*, **79**, 157 (1973).
13. Massart D. L., De Clercq H., *Anal. Chem.*, **46**, 1988 (1974).
- 13a. De Clercq H., Blockeel E., Defrise-Gussenhoven E., Massart D. L., *Anal. Chem.*, **47**, 2275 (1975).
- 13b. De Clercq H., Massart D. L., *J. Chromatogr.*, **115**, 1 (1975).
- 13в. Moffat A. C., Smalldon K. W., Brown C., *J. Chromatogr.*, **90**, 1 (1974).
- 13г. Moffat A. C., Smalldon K. W., *J. Chromatogr.*, **90**, 9 (1974).
14. Turina S., Trbojević M., Kaštelan-Macan M., *Anal. Chem.*, **46**, 988 (1974).
15. Baker A. G., Carr P. J., Nickless G., *Chem. Ind. (London)*, **2**, 901 (1972).
16. Panova D. J., Mincheva M. F., Minchev A. D., *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, **25**, 1245 (1972).
- 16a. Rouser G., *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 60 (1973).
17. Loftis P. F., Purdy S. J., Truter E. V., *Lab. Pract.*, **18**, 1167 (1969).
18. Ošćik J., Rózylo J. K., *Chromatographia*, **4**, 516 (1971).
19. Snyder L. R., *J. Chromatogr.*, **63**, 15 (1971).
20. *Ibid.*, **25**, 274 (1966).
21. Thoma J. A., *Anal. Chem.*, **37**, 500 (1965).
22. Thoma J. A., Perisho C. R., *Anal. Chem.*, **39**, 745 (1967).
23. Thoma J. A., "Polar Solvents, Supports, and Separation", in *Advances in Chromatography*, Vol. 6, J. C. Giddings and R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1968, p. 61.

24. Waksmundzki A., Rózylo J. K., J. Chromatogr., 49, 313 (1970).
25. Rózylo J. K., J. Chromatogr., 85, 136 (1973).
26. Nichols B. W., Biochim. Biophys. Acta, 70, 417 (1963).
27. Kunz F., Kostin D., Clin. Chim. Acta, 27, 185 (1970).
28. Roeder E., "Azeotropic Mixtures as Chromatographic Solvents in TLC", Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. II, A. Niederwiesser, G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 93.
29. Manthey J. A., Amundson M. E., J. Chromatogr., 19, 522 (1965).
30. Holtz R. B., Swenson P., Abel M., Walter T. A., Lipids, 6, 523 (1971).
31. Parodi P. W., Dunstan R. J., Aust. J. Dairy Technol., 23, 20 (1968).
32. Asakawa Y., Genjida F., Matsuura T., Anal. Lett., 2, 333 (1969).
33. Bucke C., J. Chromatogr., 31, 247 (1967).
34. Crosby D. G., Aharonson N., J. Chromatogr., 25, 330 (1966).
35. Abbott D. C., Egan H., Hammond E. W., Thomson J., Analyst (London), 89, 480 (1964).
36. Rosi D., Hamilton P., J. Chromatogr., 9, 388 (1962).
37. Brenner M., Niederwieser A., Experientia, 16, 378 (1960).
38. Urion E., Metche M., Haluk J. P., Brauwissenschaft, 16, 211 (1963).
39. Nybom N., J. Chromatogr., 14, 118 (1964).
40. Sloane-Stanley G. H., Bowler L. M., Lab. Pract., 11, 769 (1962).
41. Wollish E. G., Schmall M., Hawrylyshyn M., Anal. Chem., 33, 1138 (1961).
42. Ford M. A., Lab. Pract., 16, 322 (1967).
43. Badings H. T., Wassink J. G., Netn. Milk Dairy J., 17, 132 (1963).
44. Sankoff I., Sourkes T. L., Can. J. Biochem. Physiol., 41, 1381 (1963).
45. Jensen J., J. Chromatogr., 10, 236 (1963).
46. Karpitschka N., Mikrochim. Acta, 1963, 157.
47. Hara S., Takeuchi M., Matsumoto N., Bunseki Kagaku, 13, 359 (1964).
48. Jaenchen D., J. Chromatogr., 14, 261 (1964).
49. Stahl E., "Instruments Used in Thin-Layer Chromatography and their Operation", in Thin-Layer Chromatography, E. Stahl, Ed., Academic Press, New York, 1965, p. 18.
50. Wasicky R., Naturwissenschaften, 50, 569 (1963).
51. Procházka Z., Chem. Listy, 55, 974 (1961).
52. Davídek J., Davídková E., Pharmazie, 16, 352 (1961).
53. Lapp C., Erali K., Bull. Sci. Pharmacol., 47, 49 (1940).
54. Mistryukov E. A., J. Chromatogr., 9, 311 (1962).
55. Johansson B. G., Rymo L., Acta Chem. Scand., 16, 2067 (1962).
56. Stanley W. L., Vannier S. H., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 40, 582 (1957).
57. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
58. Stanley W. L., Vannier S. H., Gentili B., J. Assoc. Off. Chem., 40, 282 (1957).
59. Seikel M. K., Millett M. A., Saeman J. F., J. Chromatogr., 15, 115 (1964).
60. Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H. A., Suppan F., Z. Naturforsch., 17B, 352 (1962).
61. Goedel L., Zimmerman W., Lommer D., Z. Physiol. Chem., 333, 35 (1963).
62. Reiser P. M., Schumacher D., Experientia, 19, 84 (1963).
63. Zoellner N., Wolfram G., Klin. Wochenschr., 40, 1098 (1962).
64. Mistryukov E. A., Collect. Czech. Chem Commun., 26, 2071 (1961).
65. Hesse G., Alexander M., Journees Intern. Etude Methodes Separation Immediate Chromatogr., Paris 1961, 1962, p. 229.
66. Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949).
67. Bryant L. H., Nature, 175, 556 (1955).
68. Sherwood A. E., Lab. Pract., 15, 1391 (1966).
69. Litt G. J., Johl R. G., J. Chromatogr., 20, 605 (1965).
70. van Ooij W. J., J. Chromatogr., 42, 432 (1969).
71. Zlatkis A., Kaiser R. E., Eds., HPTLC High Performance Thin-Layer Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1977.
72. Halpaap H., Rippahn J., "High Performance Thin-Layer Chromatography: Development, Data and Results", in HPTLC High Performance Thin-Layer Chromatography, A. Zlatkis, R. Kaiser, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1977.
73. Mottier M., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 49, 454 (1958).
74. Mottier M., Potterat M., Anal. Chim. Acta, 13, 46 (1955).
75. Truter E. V., J. Chromatogr., 14, 57 (1964).
76. Libbey L. M., Day E. A., J. Chromatogr., 14, 273 (1964).
77. Anwar M. H., J. Chem. Educ., 40, 29 (1963).
78. Nedlkovich G., Contribution au dosage de la vitamine D par chromatographie sur couche mince en continu, in Int. Symp. Chromatogr., Electro-phor., 4th, 1967, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 521.
79. Cavina G., Moretti G., J. Chromatogr., 22, 41 (1966).
80. Stewart G. H., Wendel C. T., J. Chromatogr. Sci., 13, 105 (1975).
81. Stewart G. H., Gierke T. D., J. Chromatogr. Sci., 8, 129 (1970).
82. Brenner M., Niederwieser A., Swiss Pat. 364, 130 (August 31, 1962).
83. Brenner M., Niederwieser, Experientia, 17, 237 (1961).
84. Lees T. M., Lynch M. J., Mosher F. R., J. Chromatogr., 18, 595 (1965).
85. Hara S., Mibe K., J. Chromatogr., 66, 75 (1972).
86. Hara S., Yamazaki S., Ichikawa H., Chem. Ind. (London), 1969, 1657.
87. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 12, 245 (1963).
88. Lábler L., "Thin-Layer Chromatography on Loose Layers of Alumina", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettólo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 32.
89. Johansson L., Kashemsanta S., J. Chromatogr., 45, 471 (1969).
90. van Dijk J. H., Z. Anal. Chem., 236, 326 (1968).
91. Ibid., "Horizontal Centripetal Thin-Layer Chromatography with Continuous Elution and Collection of Separated Components", in Column Chromatogr., Int. Symp. Sep. Methods, 5th 1969, E. S. Kovats, Ed., Sauerlander A. G., Aarau, Switzerland, 1970, p. 234.
92. De Deyne V. J. R., Vetter A. F., J. Chromatogr., 103, 177 (1975).
93. Turina S., Marjanovic-Krajovan V., Obradovic M., Anal. Chem., 36, 1905 (1964).
94. Turina S., Marjanovic-Krajovan V., "Continuous Separation on the TLC by the Principle of the Rotary Disc", in Int. Symp. Chromatogr., Electro-phor., 4th, 1967, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 149.
95. Visser R., Anal. Chim. Acta, 38, 157 (1967).
96. Dietrich C. P., Anal. Biochem., 51, 345 (1973).
97. Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J., Anal. Chem., 23, 415 (1951).
98. Thoma J. A., Anal. Chem., 35, 214 (1963).
99. Thoma J. A., J. Chromatogr., 12, 441 (1963).
100. Stárka L., Hampl R., J. Chromatogr., 12, 347 (1963).
101. Lenk H. P., Z. Anal. Chem., 184, 107 (1961).
102. Halpaap H., Chem.-Ing.-Tech., 35, 488 (1963).
- 102a. Petrowitz H.-J., Chem.-Ztg., 93, 329 (1969).
- 102b. Goldstein G., Anal. Chem., 42, 140 (1970).
103. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 23, 428 (1951).
104. Weicker H., Klin. Wochenschr., 37, 763 (1959).
105. Stahl E., Arch. Pharm., 292/64, 411 (1959).
106. Kaunitz H., Gauglitz E., Jr., McKay D. G., Metabolism, 12, 371 (1963).
107. Stahl E., Kallenbach U., J. Chromatogr., 5, 458 (1961).
108. Dyer T. A., J. Chromatogr., 11, 414 (1963).
109. Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Dtsch. Apoth.-Ztg. 100, 283 (1960).
110. Zoellner N., Wolfram G., Klin. Wochenschr., 40, 1100 (1962).
111. Baumann U., Z. Anal. Chem., 173, 458 (1960).

112. Gaenshirt H., Koss F. W., Morianz K., *Arzneimittel—Forsch.*, **10**, 943 (1960).
113. Vacíková A., Felt V., Malíková J., *J. Chromatogr.*, **9**, 301 (1962).
114. Hernández Alvarado F., *J. Chromatogr.*, **42**, 144 (1969).
115. Székely G., *J. Chromatogr.*, **42**, 543 (1969).
116. Narasimhulu S., Keswani I., Flickinger G. L., *Steroids*, **12**, 1 (1968).
117. Iacono J. M., Ishikawa T. T., *J. Chromatogr.*, **40**, 175 (1969).
118. Furukawa T., *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser.*, **A21**, 285 (1958); *Chem. Abstr.*, **53**, 809 (1959).
119. Tiselius A., *Ark. Kemi*, **14B**, No. 22 (1940).
120. Niederwieser A., Brenner M., *Experientia*, **21**, 50 (1965).
121. Viricel M., Gonnet C., Lamotte A., *Chromatographia*, **7**, 345 (1974).
122. Frache R., Dadone A., *Chromatographia*, **6**, 274 (1973).
123. Niederwieser A., Honegger C. C., Gradient Techniques in Thin-Layer Chromatography, in *Advances in Chromatography*, Vol. 2, J. C. Giddings and R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1966, p. 123.
124. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Е. В., Воронкова В. В., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1963**, 954.
125. Johansson B. G., Rymo L., *Biochem. J.*, **92**, 5P (1964).
126. Vergani C., Stablini R., Agostoni A., *J. Chromatogr.*, **28**, 135 (1967).
127. Calderon M., Baumann W. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 7 (1970).
128. Kaufmann H. P., Makus Z., Deicke F., *Fette, Seifen, Anstrichm* **63**, 235 (1961).
129. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 173 (1961).
130. Raymond S., Aurell B., *Science*, **138**, 152 (1962).
131. Raymond S., Nakamichi M., *Anal. Biochem.*, **7**, 225 (1964).
132. Jimeno de Osso F., *J. Chromatogr.*, **60**, 272 (1971).
133. Pollack J. D., Clark D. S., Somerson N. L., *J. Lipid Res.*, **12**, 563 (1971).
134. Zappi E., Schmidt M., Prange F., *J. Chromatogr.*, **43**, 543 (1969).
135. Anet E. F. L. J., *J. Chromatogr.*, **9**, 291 (1962).
136. Kirchner J. G., Flanagan V. P., Gordon Research Conference, Colby Junior College, New London, N. H., August 1962.
137. Kirchner J. G., Flanagan V. P., 147th Meeting of the American Chemical Society, Philadelphia, Pa., April 1964.
138. Berger J. A., Meyniel G., Blanquet P., Petit J., *Compt. Rend.*, **257**, 1534 (1963).
139. Berger J. A., Meyniel G., Petit J., *Compt. Rend.*, **255**, 1116 (1962).
140. Berger J. A., Meyniel G., Petit J., Blanquet P., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 2662.
141. Abbott D. C., Bunting J. A., Thomson J., *Analyst (London)*, **91**, 94 (1966).
142. Lakshminarayana V., Menon P. K., *Pestic. Sci.*, **2**, 103 (1971).
143. Gilmore D. R., Cortes A., *J. Chromatogr.*, **21**, 148 (1966).
144. Váradi A., *J. Chromatogr.*, **110**, 166 (1975).
145. Sable-Amplis R., Agid R., Abadie D., *J. Chromatogr.*, **94**, 287 (1974).
146. Pumphrey A. M., *Biochem. J.*, **102**, 30P (1967).
147. Bond P. S., *J. Chromatogr.*, **34**, 554 (1968).
- 147a. Kreuzig F., *J. Chromatogr.*, **142**, 441 (1977).
148. McDonald H. J., Bermes E. W., Shepherd H. G., *Naturwissenschaften*, **44**, 9 (1957).
149. McDonald H. J., McKendell L. V., Bermes E. W., *J. Chromatogr.*, **1**, 259 (1958).
150. Herndon J. F., Appert H. E., Touchstone J. C., Davis C. N., *Anal. Chem.*, **34**, 1061 (1962).
151. Korzun B. P., Brody S., *J. Pharm. Sci.*, **53**, 454 (1964).
152. Rosmus J., Pavlicek M., Deyl Z., "XII. Centrifugal Thin-Layer Chromatography", in *Thin-Layer Chromatography*, G. B. Marini-Bettollo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 119.

153. Affonso A., *J. Chromatogr.*, **22**, 1 (1966).
154. Lepoivre A., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **81**, 213 (1972).
155. Deyl Z., Rosmus J., Pavlicek M., *Chromatogr. Rev.*, **6**, 44 (1964).
156. Marchal J. G., Mittwer T., *Proc. K. Ned. Acad. Wet.*, **54C**, 391 (1951).
157. Marchal J. G., Mittwer T., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **145**, 417 (1951).
158. Mottier M., *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **47**, 372 (1956).
159. Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W., *J. Chromatogr.*, **9**, 316 (1962).
160. Furukawa T., *Nippon Kagaku Zasshi*, **80**, 45 (1959); *Chem. Abstr.*, **54**, 4107 (1960).
161. Hausser H., *Arch. Kriminol.*, **125**, 72 (1960).
162. Prey V., Berbalk H., Kausz M., *Mikrochim. Acta*, **1961**, 968.
163. Bayzer H., *Experientia*, **20**, 233 (1964).
164. Abbott D. C., Thomson J., *Chem. Ind. (London)*, **481** (1964).
165. Abbott D. C., Thomson J., *Analyst (London)*, **89**, 613 (1964).
166. Bazán N. G., Jr., Joel C. D., *J. Lipid Res.*, **11**, 42 (1970).
167. Wieland T., Determann H., *Experientia*, **18**, 431 (1962).
168. Hofmann A. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 458 (1962).
169. Rybicka S. M., *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 308.
170. Rybicka S. M., *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 1947.
171. Valentine L., Peint., *Pigm. Vernis*, **39**, 295 (1963).
172. Luzzatto L., Okoye C. N., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 705 (1967).
173. Stickland R. G., *Anal. Biochem.*, **10**, 108 (1965).
174. Hegenauer J. C., Tartof K. D., Nace G. W., *Anal. Biochem.*, **13**, 6 (1965).
175. Peterson E. A., Rowland J., *J. Chromatogr.*, **5**, 330 (1961).
176. Peterson E. A., Sober H. A., *Anal. Chem.*, **31**, 857 (1959).
177. Niederwieser A., Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta*, **48**, 893 (1965).
178. Randerath K., Randerath E., *J. Chromatogr.*, **16**, 111 (1964).
179. Tarr G. E., *J. Chromatogr.*, **52**, 357 (1970).
180. Niederwieser A., *Chromatographia*, **2**, 362 (1969).
181. Turina S., Solić Z., Marjanović V., *J. Chromatogr.*, **39**, 81 (1969).
182. Turina S., Jamnicki V., *Anal. Chem.*, **44**, 1892 (1972).
183. Giess F., Schlitt H., Klose A., *Z. Anal. Chem.*, **213**, 331 (1965).
184. Geiss F., Schlitt H., "KS" une nouvelle chambre chromatographique pour la CCM, à applications multiples", in *Int. Symp. Chromatogr., Electro-phor.*, 5th, 1968, Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1969, p. 109.
185. Dallas M. S. J., *J. Chromatogr.*, **17**, 267 (1965).
186. Prinzier H. W., Tauchmann H., *J. Chromatogr.*, **29**, 142 (1967).
187. de Zeeuw R. A., *J. Chromatogr.*, **32**, 43 (1968).
188. de Zeeuw R. A., *Anal. Chem.*, **40**, 915 (1969).
189. Van Dijk J. H., Mijs W. J., *Z. Anal. Chem.*, **236**, 419 (1968).
190. de Zeeuw R. A., *Anal. Chem.*, **40**, 2134 (1968).
191. de Zeeuw R. A., "Vapor-Programmed Thin-Layer Chromatography, Development and Applications", in *Progress in Separation and Purification*, Vol. 3, E. S. Perry, C. J. Van Oss, Eds., Wiley-Interscience, New York, 1970, p. 1.
192. Hodisan T., Gocan S., Liteanu C., *Stud. Univ. Babes-Bolyai, Ser. Chem.*, **17**, 63 (1972); through *Chem. Abstr.*, **78**, 79440k (1973).
193. Hodisan T., Bandedanu S., Liteanu C., *Stud. Univ. Babes-Bolyai, Ser. Chem.*, **17**, 119 (1972); through *Chem. Abstr.*, **78**, 105610n (1973).
194. Hodisan T., Liteanu C., *Stud. Univ. Babes-Bolyai, Ser. Chem.*, **17**, 73 (1972); through *Anal. Abstr.*, **25**, 360 (1973).
195. Liteanu C., Hodisan T., *Rev. Roum. Chim.*, **17**, 1985 (1972).
196. Gocan S., Liteanu C., *Rev. Roum. Chim.*, **17**, 661 (1972).
197. Kaufmann H. P., Mukherjee K. D., Khalid Q., *Nahrung*, **11**, 631 (1967).
198. Blasius E., Augustin H., Klemm G., *J. Chromatogr.*, **108**, 53 (1975).

199. *Caton J. E., Goldstein G.*, Anal. Biochem., **42**, 14 (1971).
200. *Margolis J., Kenrick K. G.*, Anal. Biochem., **25**, 347 (1968).
201. *Foissy H.*, J. Chromatogr., **106**, 51 (1975).
202. *Arcus A. C.*, Anal. Biochem., **37**, 53 (1970).
203. *Margolis J., Wrigley C. W.*, J. Chromatogr., **106**, 204 (1975).
204. *Martin A. J., Synge R. L. M.*, Biochem. J., **35**, 1358 (1941).
205. *Cargill D. I.*, Analyst (London), **87**, 865 (1962).
206. *Hoerhammer L., Wagner H., Koenig H.*, Dtsch. Apoth.-Ztg., **103**, 502 (1963).
207. *Kagawa T., Fukinbara T., Sumiki Y.*, Agr. Biol. Chem. (Tokyo), **27**, 598 (1963).
208. *Kaufmann H. P., Sen Gupta A. K.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 529 (1963).
209. *Knappe E., Peteri D.*, Z. Anal. Chem., **188**, 184 (1962).
210. *Ibid.*, p. 352.
211. *Petzold J. A., Camp W., Kirch E. R.*, J. Pharm. Sci., **52**, 1106 (1963).
212. *Knappe E., Peteri D.*, Z. Anal. Chem., **190**, 380 (1962).
213. *Bennett R. D., Heftmann E.*, J. Chromatogr., **9**, 353 (1962).
214. *Patton S., Kenney P. G., Boyd E. N.*, Mfg. Confect., **44**, 35 (1964).
215. *Yawata M., Gold E. M.*, Steroids, **3**, 435 (1964).
216. *Hofmann A. F.*, "Thin-Layer Chromatography of Bile Acids and their Derivateives", and "Hydroxyapatite as an Absorbent for Thin-Layer Chromatography: Separations of Lipids and Proteins", in New Biochemical Separations, A. T. James, L. J. Morris, Eds., Van Nostrand, New York, 1964, p. 261, 283.
217. *Kaufmann H. P., Khoe T. H.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **64**, 81 (1962).
218. *Kaufmann H. P., Das B.*, Fette, Seifen, Anstrichm., **65**, 398 (1963).
219. *Davidek J.*, "Chromatography on Thin-Layer of Starch with Reversed Phases", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettólo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 117.
220. *Davidek J., Janiček G.*, J. Chromatogr., **15**, 542 (1964).
221. *Hjerten S.*, Arch. Biochem. Biophys., Suppl., **1**, 147 (1962).
222. *Halpaap H., Klatyk K.*, J. Chromatogr., **33**, 80 (1968).
223. *Belenkii B. G., Gankina E. S.*, J. Chromatogr., **53**, 3 (1970).
224. *Donkai N., Inagaki H.*, J. Chromatogr., **71**, 473 (1972).
225. *Otocka E. P., Hellman M. Y., Muglia P. M.*, Macromolecules, **5**, 227 (1972).
226. *Jaworek D.*, Chromatographia, **2**, 289 (1969).
227. *James A. N., Pickard E., Sholton P. G.*, J. Chromatogr., **32**, 64 (1968).
228. *Konishi K., Yamaguchi S.*, Anal. Chem., **38**, 1755 (1966).
229. *Nystroem E., Sjoevall J.*, Anal. Biochem., **12**, 235 (1965).
230. *Nystroem E., Sjoevall J.*, Anal. Biochem., **17**, 574 (1965).
231. *Slagt C., Sipman W. A.*, J. Chromatogr., **74**, 352 (1972).
232. *Pomeranz Y.*, Chemist-Analyst, **54**, 57 (1965).
233. *Calzolari C., Favretto L., Stancher B.*, J. Chromatogr., **54**, 373 (1971).
234. *Tanford C., Kawahara K., Lapahje S.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 729 (1967).
235. *Klaus G. G. B., Nitecki D. E., Goodman J. W.*, Anal. Biochem., **45**, 286 (1972).
236. *Heinz F., Prosch W.*, Anal. Biochem., **40**, 327 (1971).
237. *Wasyl Z., Luchter-Wasyl E., Btelanski W., KJr.*, Biochim. Biophys. Acta, **285**, 279 (1972).
238. *Dizik N. S., Knapp F. W.*, J. Food Sci., **35**, 282 (1970).
239. *Peereboom J. W. C., Beekes H. W.*, J. Chromatogr., **39**, 339 (1969).
240. *Jaworek D.*, "Duennschicht-Chromatographie und Elektrophorese an Molekularsieben", in Int. Symp. Chromatogr. Electrophor., 6th 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 118.
241. *Parrish J. R.*, J. Chromatogr., **33**, 542 (1968).
242. *Horobin R. W., Gardiner J.*, J. Chromatogr., **43**, 545 (1969).
243. *Stránský Z., Srch M.*, J. Chromatogr., **28**, 146 (1967).
244. *Blessing M. H., Gebele B.*, Res. Exp. Med., **162**, 143 (1974).
245. *Radola B. J.*, J. Chromatogr., **38**, 61 (1968).
246. *Ibid.*, **38**, 78 (1968).
247. *Hruska K. J., Franek M.*, J. Chromatogr., **93**, 475 (1974).
248. *Miller J. N., Erinle O., Roberts J. M., Thirkettle C.*, J. Chromatogr., **105**, 317 (1975).
249. *Otocka E. P.*, Adv. Chem. Ser., No. 125, 55 (1973).
250. *Determann H.*, Gel Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, 1968, p. 51.
251. *Wieland T., Determann H.*, J. Chromatogr., **28**, 2 (1967).
252. *Williams K. W.*, Lab. Pract., **22**, 306 (1973).
253. *Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **40**, 33 (1946).
254. *Wieme R. J., Rabaey M.*, Naturwissenschaften, **44**, 112 (1957).
255. *Wieme R. J.*, Clin. Chim. Acta, **4**, 317 (1959).
256. *Baur E. W.*, private communication.
257. *Baur E. W.*, J. Lab. Clin. Med., **61**, 166 (1963).
258. *Ramsey H. A.*, Anal. Biochem., **5**, 83 (1963).
259. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **9**, 21 (1964).
260. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **10**, 29 (1965).
261. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **9**, 29 (1964).
262. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **9**, 213 (1964).
263. *Kowalczyk J.*, J. Chromatogr., **14**, 411 (1964).
264. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 659 (1963).
265. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 823 (1963).
266. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 835 (1963).
267. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **9**, 891 (1964).
268. *Kowalczyk J.*, Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 899 (1963).
269. *Correni E.*, Naturwissenschaften, **51**, 40 (1964).
270. *Dangerfield W. G.*, Nature, **202**, 520 (1964).
271. *Eriksen L.*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **10**, 39 (1958).
272. *Weiner L. M., Zak B.*, Clin. Chim. Acta, **9**, 407 (1964).
273. *Wada H., Snell E. E.*, Anal. Biochem., **46**, 548 (1972).
274. *Holmes R.*, Biochim. Biophys. Acta, **133**, 174 (1967).
275. *Zak B., Weiner L. M., Baginski E.*, J. Chromatogr., **20**, 157 (1965).
276. *Herd J. K., Motycka L.*, Anal. Biochem., **53**, 514 (1973).
277. *Acharya U. S. V., Swaminathan M., Sreenivasan A., Subrahmanyam V.*, Indian J. Med. Res., **52**, 224 (1964).
278. *Давлятов Ю.*, Узб. биол. жур., **7**, 45 (1963).
279. *van der Helm H. J., Holster M. G.*, Clin. Chim. Acta, **10**, 483 (1964).
280. *Pette D.*, Klin. Wochenschr., **36**, 1106 (1958).
281. *Popadiuk L.*, Arch. Immunol. Terapii Dosw., **9**, 139 (1961).
282. *Ramanathan A. N.*, Antiseptic (Madras, India), **60**, 1017 (1963).
283. *Вайчувенас В. А.*, Лабор. дело, **9**, № 6, 7 (1963).
284. *Вайчувенас В. А.*, Материалы I-го совещания по клинической биохимии. Рига, 1962, стр. 151.
285. *Wieme R. J.*, Behringwerk-Mitt., **34**, 27 (1958).
286. *Wieme R. J.*, J. Chromatogr., **1**, 166 (1958).
287. *van Arkel C., Ballieux R. E., Jordan F. L. J.*, J. Chromatogr., **11**, 421 (1963).
288. *Bruaux P., Dormal S., Thomas G.*, Ann. Biol. Clin. (Paris), **22**, 375 (1964).
289. *Дальгелите П., Юхнявичюте Л., Вайчувенас В.*, Лабор. дело, **9**, № 5, 5 (1963).
290. *van Sande M., van Ros G.*, Ann. Soc. Belge Med. Trop., **43**, 537 (1963).
291. *Yakulis V. J., Heller P., Josephson A. M., Singer L., Hall L.*, Am. J. Clin. Pathol., **34**, 28 (1960).
292. *Dose K., Risi S.*, Z. Anal. Chem., **205**, 394 (1964).

293. *Pfrunder B., Zurflueh R., Seiler H., Erlenmeyer H.*, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1153 (1962).
294. *Russell B., Levitt J., Polson A.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 622 (1964).
295. *Egorov A. M., Vakhobov A. Kh., Chernyak V. Ya.*, *J. Chromatogr.*, **46**, 143 (1970).
296. *Bengtsson S., Philipson L.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 399 (1964).
297. *Duckwarth M., Yaphe W.*, *Anal. Biochem.*, **44**, 636 (1971).
298. *Porath J., Janson J.-C., Lääs T.*, *J. Chromatogr.*, **60**, 167 (1971).
299. *Lääs T.*, *J. Chromatogr.*, **66**, 347 (1972).
300. *Храмов В. А., Галаев Ю. В.*, *Лаб. дело*, **14**, 311 (1968).
301. *Danehold B., Ringborg U., Egyhazy E., Lambert B.*, *Nature*, **218**, 292 (1968).
302. *Davies D. R., Spurr E. D., Versey J. B.*, *Clin. Sci.*, **40**, 411 (1971).
303. *Dony J., Beys B., Rappe A., Muldermans H.*, "Quelques applications de l'analyse immunoelectrophoretique a des medicaments d'origine animale", in *Int. Symp. Chromatogr., Electrophor.*, 5th 1968, Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1969, p. 552.
304. *Kostner G., Holasek A.*, *Anal. Biochem.*, **46**, 680 (1972).
305. *Laurell C.-B.*, *Anal. Biochem.*, **15**, 45 (1966).
306. *Hazama H., Uchimura H.*, *Microchem. J.*, **17**, 318 (1972).
307. *Baudler M., Stuhlmann F.*, *Naturwissenschaften*, **51**, 57 (1964).
308. *Baur E. W.*, private communication.
309. *Baur E. W.*, *Science*, **140**, 816 (1963).
310. *Baur E. W.*, *Clin. Chim. Acta*, **9**, 252 (1964).
311. *Baur E. W., Rowley N. M., Motulsky A. G.*, Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Boulder, Col., August 26—28, 1964.
312. *Berkeš-Tomašević P., Rosić J., Berkeć I.*, *Acta Pharm. Jugosl.*, **13**, 69 (1963).
313. *Efremov G., Vaskov B., Duma H., Andrejeva M.*, *Acta Med. Jugosl.*, **17**, 252 (1963); through *Chem. Abstr.*, **61**, 12305 (1964).
314. *Marsh C. L., Joliff C. R., Payne L. C.*, *Tech. Bull. Regist. Med. Technol.*, **34**, 1 (1964).
315. *Berkeš-Tomašević P., Rosić J., Ignjatović M.*, *Arh. Farm. (Belgr.)*, **13**, 9 (1963).
316. *Daams J. H.*, *J. Chromatogr.*, **10**, 450 (1963).
317. *Espinosa E.*, *Anal. Biochem.*, **9**, 146 (1964).
318. *Euler H. V.*, *Acta Biochem. Pol.*, **11**, 311 (1964).
319. *Groulade J., Fine J. N., Olliver C.*, *Nature*, **191**, 72 (1961).
320. *Groulade J., Ollivier C.*, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **18**, 595 (1960).
321. *Korngold L.*, *Anal. Biochem.*, **6**, 47 (1963).
322. *Raymond S.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 350 (1964).
- 322a. *Burns D. J. W., Turner N. A.*, *J. Chromatogr.*, **30**, 469 (1967).
323. *Styvesant W. V.*, *Nature*, **214**, 405 (1967).
324. *Reid M. S., Bielecki R. L.*, *Anal. Biochem.*, **22**, 374 (1968).
325. *Roberts R. M., Jones J. S.*, *Anal. Biochem.*, **49**, 592 (1972).
326. *De Wachter R., Fiers W.*, *Anal. Biochem.*, **49**, 184 (1972).
327. *Ritschard W. J.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 327 (1964).
328. *Cunningham L., Rasch E. M., Lewis A. L., Heitsch R.*, *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 853 (1970).
329. *Daams J. H.*, *J. Chromatogr.*, **10**, 450 (1963).
330. *Ramsey H. A.*, *Anal. Biochem.*, **5**, 83 (1963).
331. *Schaffer H. E., Johnson F. M.*, *Anal. Biochem.*, **51**, 577 (1973).
332. *Pastuska G., Trinks H.*, *Chem.-Ztg.*, **85**, 535 (1961).
333. *Ibid.*, **86**, 135 (1962).
334. *Criddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R.*, *J. Chem. Educ.*, **41**, 609 (1964).
335. *Criddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R.*, *Nature*, **203**, 1327 (1964).
336. *Moghissi A.*, *Anal. Chim. Acta*, **30**, 91 (1964).
337. *Frache R., Dadone A.*, *Chromatographia*, **6**, 430 (1973).
338. *Agurell S.*, *Acta Pharm. Suecica*, **2**, 357 (1965).
339. *Sargent J. R., Vadlamudi B. P.*, *Anal. Biochem.*, **25**, 583 (1968).
340. *Nast H.-P., Fasold H.*, *J. Chromatogr.*, **27**, 499 (1967).
341. *Stefanovich V.*, *J. Chromatogr.*, **31**, 466 (1967).
342. *Raymond S., Weintraub L.*, *Science*, **130**, 711 (1959).
343. *Raymond S.*, *Clin. Chem.*, **8**, 455 (1962).
344. *Baumgarten A.*, *Blood*, **22**, 466 (1963).
345. *Baumgarten A.*, *Nature*, **199**, 490 (1963).
346. *Raymond S., Wang Y.-J.*, *Anal. Biochem.*, **1**, 391 (1960).
347. *Smithies O.*, *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 125 (1962).
348. *Ornstein L.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964).
349. *Dose K., Krause G.*, *Naturwissenschaften*, **49**, 349 (1962).
350. *Fasella P., Giartosio A., Turano C.*, "Applications of Thin-Layer Chromatography on Sephadex to the Study of Proteins", in *Thin-Layer Chromatography*, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 205.
351. *Vendrelly R., Coirault Y., Vanderplancke A.*, *Compt. Rend.*, **258**, 6399 (1964).
352. *Keck K., Hagen U.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 685 (1964).
353. *Augusti-Tocco G., Carestia C., Grippo P., Parisi E., Scarano E.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 8 (1968).
354. *Bayzer H.*, *J. Chromatogr.*, **27**, 104 (1967).
355. *Nygaard P.*, *J. Chromatogr.*, **30**, 240 (1967).
356. *Wan A. S. C.*, *J. Chromatogr.*, **60**, 371 (1971).
357. *Burns D. J. W., Turner N. A.*, *J. Chromatogr.*, **30**, 469 (1967).
358. *Montant Ch., Rouze-Soulet J. M.*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 161 (1960).
359. *Bielecki R. L., Turner N. A.*, *Anal. Biochem.*, **17**, 278 (1966).
360. *Cook A. R., Bielecki R. L.*, *Anal. Biochem.*, **28**, 428 (1969).
361. *Lopiekes D. V., Dastoli F. R., Price S.*, *J. Chromatogr.*, **23**, 182 (1966).
362. *Dobici F., Grassini G.*, *J. Chromatogr.*, **10**, 98 (1963).
363. *Affonso A.*, *J. Chromatogr.*, **31**, 646 (1967).
364. *Szylił M.*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1884 (1967).
365. *Raymond S., Aurell B.*, *Science*, **138**, 152 (1962).
366. *Raymond S., Nakamichi M.*, *Anal. Biochem.*, **7**, 225 (1964).
367. *Espinosa E.*, *Anal. Biochem.*, **9**, 146 (1964).
368. *Kaltschmidt E., Wittmann H. G.*, *Anal. Biochem.*, **36**, 401 (1970).
369. *Avital S., Elson D.*, *Anal. Biochem.*, **57**, 287 (1974).
370. *Clarke H. G. M., Freeman T.*, *Clin. Sci.*, **35**, 403 (1963).
371. *Converse C. A., Papermaster D. S.*, *Science*, **189**, 469 (1975).
372. *Iheda K., Suzuki S.*, *U. S. Pat.* **1**, 015, 891 (January 30, 1912).
373. *Williams R. R., Waterman R. E.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **27**, 56 (1929/30).
374. *Vesterberg O., Svensson H.*, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 820 (1966).
375. *Vesterberg O.*, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2653 (1969).
376. *Righetti P. G., Drysdale J. W.*, *J. Chromatogr.*, **98**, 271 (1974).
377. *Drysdale J. W., Righetti P. G., Bunn H. F.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **229**, 42 (1971).
378. *Been A. C., Rausch E. M.*, *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 368 (1972).
379. *Ibid.*, **18**, 675 (1970).
380. *Delincee H., Radola B. J.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **200**, 404 (1973).
381. *Awden Z. L., Williamson A. R., Askonas B. A.*, *Nature*, **219**, 447 (1968).
382. *Leaback D. H., Rutter A. C.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 447 (1968).
383. *Vector O.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **257**, 11 (1972).
384. *Avital S., Elson D.*, *Anal. Biochem.*, **57**, 274 (1974).
385. *Awdeh Z. L., Williamson A. R., Askonas B. A.*, *Nature*, **219**, 66 (1968).

386. *Criddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R.*, *Analyst* (London), **94**, 461 (1969).
387. *Finlayson G. R., Chrumbach A.*, *Anal. Biochem.*, **40**, 292 (1971).
388. *Wada H., Snell E. E.*, *Anal. Biochem.*, **46**, 548 (1972).
389. *Kohnert K.-D., Schmid E., Zuehlke H., Fiedler H.*, *J. Chromatogr.*, **76**, 263 (1973).
390. *Loerning U. E.*, *Biochem. J.*, **102**, 251 (1967).
391. *Righetti P. G., Drysdale J. W.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 163 (1973).
392. *Bates L. S., Deyoe C. W.*, *J. Chromatogr.*, **73**, 296 (1972).
393. *Florini J. R., Brivio R. P., Battelle B.-A.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 299 (1973).
394. *Robinson H. K.*, *Anal. Biochem.*, **49**, 353 (1972).
395. *Vinogradov S. N., Lowenkron S., Andonian M. R., Bagshaw J., Felgenhauer K., Pak S. J.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 501 (1973).
396. *Lundblad G., Vesterberg O., Zimmerman R., Ling J.*, *Acta Chem. Scand.*, **26**, 1711 (1972).
397. *Righetti P. G., Pagani M., Gianazza E.*, *J. Chromatogr.*, **109**, 341 (1975).
398. *Gianazza E., Pagani M., Luzzana M., Righetti P. G.*, *J. Chromatogr.*, **109**, 357 (1975).
399. *Bours J.*, *J. Chromatogr.*, **60**, 225 (1971).
400. *Lewin S.*, *Biochem. J.*, **118**, 37p (1970).
401. *Finlayson G. R., Chrumbach A.*, *Anal. Biochem.*, **40**, 292 (1971).
402. *Blaich R.*, *Naturwissenschaften*, **58**, 55 (1971).
403. *Humphreys K. C.*, *J. Chromatogr.*, **49**, 503 (1970).
404. *Smyth C. J., Wadstroem T.*, see Ref. 376.
405. *Lewin S.*, *Biochem. J.*, **117**, 41 (1970).
406. *Graesslin D., Trautwein A., Bettendorf G.*, *J. Chromatogr.*, **63**, 475 (1971).
407. *Fantes K. H., Furminger I. G. S.*, *Nature*, **215**, 750 (1967).
408. *Peterson R. F.*, *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 595 (1971).
409. *Vesterberg O.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 23 (1973).
410. *Bunn H. F.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 345 (1973).
411. *Jordan E. M., Raymond S.*, *Anal. Biochem.*, **27**, 205 (1969).
412. *Frater R.*, *J. Chromatogr.*, **50**, 469 (1970).
413. *Latner A. L., Parsons M. E., Skillen A. W.*, *Biochem. J.*, **118**, 298 (1970).
414. *Wrigley C. W., Shepherd K. W.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 154 (1973).
415. *Latner A. L.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 281 (1973).
416. *Dale G., Latner L. L.*, *Z. Clin. Chim. Acta*, **24**, 61 (1969).
417. *Macko V., Stegemann H.*, *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 917 (1969).
418. *Kenrick K. G., Margolis J.*, *Anal. Biochem.*, **33**, 204 (1970).
419. *Catsimpoalas N.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 144 (1973).
420. *Catsimpoalas N.*, *Sci. Tools*, **16**, 1 (1969).
421. *Riley R. F., Coleman M. K.*, *J. Lab. Clin. Med.*, **72**, 714 (1968).
422. *Quast R.*, *J. Chromatogr.*, **54**, 405 (1971).
423. *Radola B. J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 412 (1973).
424. *Radola B. J.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 127 (1973).
425. *Hayes M. B., Wellner D.*, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6636 (1969).
426. *Li Y.-T., Li S.-C.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **209**, 187 (1973).
427. *Spencer E. M., King T. P.*, *J. Biol. Chem.*, **246**, 201 (1971).
- 427a. *Arbuthnott J. P., Beeley J. A.*, Eds., *Isoelectric Focusing*, Butterworths, Woburn, Mass., 1975.
428. *Brandt K.*, *Amer. Lab.*, **4**, 69 (1972).
429. *Fosslien E.*, *J. Chromatogr.*, **63**, 59 (1971).
430. *Snyder F., Smith D.*, "An Automated System for Sample Collection and Computer Analysis of Thin-Layer Radiochromatograms", In *Separation Techniques in Chemistry and Biochemistry*, R. A. Keller, Ed., Marcel Dekker, New York, 1967, p. 331.

431. *Fosslien E., Musil F., Domizi D., Blickenstaff L., Lumeng J.*, *J. Chromatogr.*, **63**, 131 (1971).
432. *Kasang G., Goeldner G., Weiss N.*, *J. Chromatogr.*, **59**, 393 (1971).
433. *Ismail A. A., Harkness R. A.*, *Biochem. J.*, **99**, 717 (1966).
434. *Sanders D. L., Snyder L. R.*, *J. Chromatogr., Sci.*, **8**, 706 (1970).
435. *Halpaap H., Bausch H.*, BRD Pat. 2,026,304 (December 15, 1971).
436. *Schneck L., Pourfar M., Benjamin A.*, *J. Lipid Res.*, **11**, 66 (1970).
437. *Philp J. M.*, *Proc. Soc. Anal. Chem.*, **9**, 293 (1972).
438. *Perry J. A., Jupille T. H., Glunz L. J.*, *Anal. Chem.*, **47**, 65A (1975).
439. *Perry J. A.*, *J. Chromatogr.*, **110**, 27 (1975).
440. *Ibid.*, **113**, 267 (1975).
441. *Faulk H., Krummen K.*, *J. Chromatogr.*, **103**, 279 (1975).
442. *Vitek R. K., Seul C. J., Baier M., Lau E.*, *Am. Lab.*, **6**, 109 (1974).

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА ПЛАСТИНКАХ

Инертность материалов, используемых в ТСХ, делает их идеально пригодными для применения сильнодействующих реактивов. Миллер и Кирхнер [1] в 1953 г. впервые высказали и развили идею о возможности проведения химических реакций непосредственно на хроматографических пластинках. В этом методе пробу можно поместить на пластинку и нанести на пробу реактив. По завершении реакции можно путем элюирования соответствующим растворителем разделить продукты реакции. В тех случаях, когда этот метод непригоден, реактив и исходное соединение, согласно предложению Метиса и Оуриссона [2], можно смешать в микроколичествах в маленькой пробирке или в капилляре. Полученную смесь можно после этого нанести непосредственно на хроматографическую пластинку. Зная величины R_f исходного соединения и продуктов реакции, нередко можно с уверенностью идентифицировать соединение. Так, например, если пробу цитраля нанести на пластинку с силикагелем и добавить каплю 30 %-ного пероксида водорода, а затем облучить в течение 10 мин УФ-светом, то в результате окисления образуется гераниевая кислота. На другую пробу цитраля можно нанести каплю 10 %-ного раствора алюмогидрида лития в эфире. При этом происходит восстановление цитраля в гераниол. Проведя хроматографирование и найдя значения R_f продуктов этих двух реакций, а также величину R_f исходного соединения, легко идентифицировать последнее. Многочисленные примеры, приведенные в данной главе (табл. 6.1), иллюстрируют не только универсальность этого метода, но и широкие возможности применения тонкослойной хроматографии для анализа многих соединений различных типов. Впрочем, в такой демонстрации нет особой необходимости, если принять во внимание огромное количество описанных в литературе разделений разнообразных соединений на различных адсорбентах.

Реакции на пластинках нередко проходят не полностью, в результате чего в смеси присутствуют как исходное соединение, так и продукты реакции.

Во многих случаях можно использовать специфические реакции, позволяющие получить обширную информацию о неизвестном соединении при ничтожной затрате исходного вещества. Химические реакции, применяемые в ТСХ, можно свести в таблицу, и, вероятно, ознакомившись с этой таблицей, хроматографист придумает новые варианты* этого метода.

1. ОКИСЛЕНИЕ

Пятно окисляемой пробы помещают на стартовой линии и наносят на него каплю насыщенного раствора хромового ангидрида в ледяной уксусной кислоте. Некоторые соединения можно окислить действием 30 %-ного раствора пероксида водорода при 10-минутном облучении УФ-светом [1].

Кофод и сотр. [3, 4] окисляли феноптиазины в соответствующие сульфоксиды после разделения на силикагеле путем обработки пятен 10—20 %-ными растворами пероксида водорода. По-видимому, в результате окисления 30 %-ным раствором пероксида водорода с последующей сушкой горячим воздухом образовывался другой продукт со значением R_f меньшим, чем у сульфоксида; можно предположить, что это был сульфон.

Огнянов [5, 6] после разделения обрабатывал пластинку озоном, чтобы сделать пятна компонентов видимыми. Разумеется, эту реакцию можно провести и до разделения. В этом случае после нанесения пробы пластинку помещают в эксикатор, в газовой фазе которого содержится 10—15 % озона. Через 15—20 мин пластинку извлекают и выдерживают на воздухе, чтобы удалить избыток озона.

Фурмен и Джераломон [7] исследовали пригодность этой реакции для идентификации большого числа соединений с применением различных реактивов для обнаружения продуктов окисления. Парафиновые углеводороды и алифатические амины обрабатывали озоном не при комнатной температуре, а при 55—90°C. Перед опрыскиванием пластинки детектирующим реактивом необходимо удалить с нее избыток озона.

Вейдемен [8] окислял 2-дезоксиполиолы на силикагеле 0,1 %-ным раствором иодной кислоты в 20 %-ной ортофосфорной кислоте при 15-минутном нагревании при 50°C. Избыток

* Полезные сведения для проведения химических реакций с целью улучшения разделения, а также для селективного детектирования читатель может найти в следующих книгах: 1) Черонис Н. Д., Ма Т. С. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа.— М.: Химия, 1973; 2) Инструментальные методы анализа функциональных групп органических соединений. Под ред. С. Сиггна.— М.: Мир, 1974.— Прим. ред.

Результаты хроматографической идентификации терпенов и других
на пластинках с крем

Соединение	Окисление CrO ₃ ^в	Восстановление		Дегидратация, H ₂ SO ₄ ^в
		изопропоксид алюминия ^г	алюмогидрид лития	
Карвеол	Карвон			Углеводород
Линалоол	Цитраль			Углеводород
Гераниол	Цитраль			Углеводород
α-Терпинеол	Не реагирует	Не реагирует		Углеводород
Нопол	Не реагирует			
Метилгептенол	Метилгептенон			Не реагирует
Октиловый спирт				Не реагирует
Нерол	Цитраль			Углеводород
Пулегон	Не реагирует	Не реагирует	Пулегол ^в	Не реагирует
Метилгептенон	Не реагирует	Метилгептенон		Не реагирует
Карвон		Карвеол	Карвеол ^в	Не реагирует
Цитраль	Не реагирует	Гераниол	Гераниол ^в	Не реагирует
Лауриновый альдегид	Не реагирует			Не реагирует
Циннамальде- гид		Циннамиловый спирт	Циннамиловый спирт ^в	Не реагирует
Цитронеллол				Не реагирует
Фурфураль				
Моноксид линалоола			Восстановле- ние ^в	
Терпенилацетат		Не реагирует	Терпинеол ^в	Следы углево- дорода
Линалоил- ацетат				Следы углево- дорода
Карвилацетат				Не реагирует
Геранилацетат				
Нерилацетат			Нерол ^г	

^а С разрешения Am. Chem. Soc.

^б «Не реагирует» означает, что не наблюдается никаких продуктов реакции. даются из-за мешающего действия уксусной кислоты. При реакции дегидратации родов.

^в Реакция проводится непосредственно на пластинке.

^г Реакцию проводят в пробирке и полученную смесь хроматографируют.

компонентов эфирных масел с использованием химических реакций
невой кислотой [1]^{а, б}

Таблица 6 I

Гидролиз, КОН ^г	Производные			
	семикарбазон ^в	3,5-динитробен- зоат ^г	фенилгидразон ^в	фенилизоцианат ^г
		Не реаги- рует Бензоат		Карбамат
		Не реаги- рует		Карбамат
		Бензоат		Карбамат
		Бензоат		Карбамат
	Не реагирует		Гидразон	
	Семикарбазон		Гидразон	
	Не реагирует		Не реаги- рует	
	2 семикарба- зона		Гидразон	
	Семикарбазон		Гидразон	
	Семикарбазон		Гидразон	
	Семикарбазон		Гидразон	
Терпинеол Линалоол				
Карвеол				
Гераниол				
Нерол				

При окислении цитраля до гераниевой кислоты продукты окисления не наблю-
даются «не реагирует» означает, что не наблюдается образование углеводо-

иодной кислоты он разрушал диоксидом серы, после чего опрыскивал пластинку детектирующим реактивом.

Фрийнс [9] окислял резерпин и ресциннамин, экспонируя полученные хроматограммы на дневном свете в расчете на спонтанное окисление соединений кислородом воздуха до 3-оксипроизводных. Уилк и сотр. [10] окисляли нафталин на слоях силикагеля кислородом воздуха при 100 °С в течение 10 мин после опрыскивания трифторуксусной кислотой.

Касс и Матис [11] окисляли алкалоиды на пластинке 10 %-ным раствором хромовой кислоты в ледяной уксусной кислоте. В другом случае алкалоиды окисляли *n*-нитробензойной кислотой в капиллярах и уже после этого наносили пробу на пластинку.

Чтобы разделить стрихнин и бруцин, Русики и Хеннеберг [12] наносили бихромат калия на пробу в стартовой точке. Далее пробу элюировали смесью бутанола и 36 %-ной соляной кислоты. Бруцин окислялся бихроматом до *o*-хинона, который оставался в стартовой точке, а стрихнин перемещался по слою адсорбента. Мейлинс и Менгольд [13] и Менгольд [14] при разделении насыщенных жирных кислот и сложных эфиров в присутствии ненасыщенных соединений обрабатывали хроматограмму смесью надуксусная кислота—уксусная кислота—вода (2:15:3). Таким образом, окислитель вводился непосредственно в элюент. Благодаря этому ненасыщенные соединения окислялись и двигались вместе с фронтом растворителя.

Хеммон и Мартин [15], чтобы окислить 17-оксикортикостероиды до 17-кетостероидов, дважды опрыскивали пластинку 10 %-ным водным раствором иодата натрия и нагревали ее приблизительно до 50 °С.

Гарднер [16] при двумерном хроматографическом разделении фосфорорганических пестицидов после первого разделения окислял компоненты смеси парами брома, затем проводил разделение в перпендикулярном направлении и после этого детектировал разделенные компоненты с помощью реакции ингибирования ферментов (Т-113).

Матис и Оуриссон [2] окисляли пробы в капиллярах *n*-нитронадбензойной кислотой, гипобромитом натрия и тетраоксидами осмия и рутения.

2. ВОССТАНОВЛЕНИЕ

При восстановлении алюмогидридом лития на пятно пробы наносят каплю 10 %-ного раствора этого реактива в эфире. При этом не следует наносить слишком большой избыток реактива, поскольку он энергично реагирует с водой, содержащейся в элюенте, а в некоторых случаях и с самим элюентом. Избыток ре-

актива можно удалить с пластинки медицинской пипеткой. При восстановлении сложных эфиров необходимо проводить реакцию в маленькой пробирке или капилляре и лишь потом наносить пробу на пластинку. Таким же образом рекомендуется проводить предварительные реакции и при восстановлении проб изопропоксидом алюминия. Для этого вводят в маленькую пробирку каплю раствора пробы, добавляют к ней каплю раствора, содержащего 5 г изопропоксида алюминия в 50 мл бензола, и нагревают до появления капель конденсата на холодной части пробирки. Пробирку центрифугируют и после этого наносят каплю реакционной смеси на хроматографическую пластинку.

Хемман и Мартин [15] восстанавливали стероиды свежеприготовленным раствором, состоящим из равных объемов 10 %-ного спиртового раствора борогидрида натрия и 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Восстановление проводили в течение 30 мин и избыток реагента нейтрализовали 25 %-ным раствором кислоты. Смит и Прайс [17] нашли, что для восстановления 7-кетохолестерина достаточно обработать его в течение 5 мин 1 %-ным раствором борогидрида натрия в метаноле. Аналогичный метод был использован для восстановления гидроперекисей стероидов [18]. Полесук и Ма [19] и Касс и Матис [11] восстанавливали алкалоиды, опрыскивая пластинку раствором борогидрида натрия. Глейзер и сотр. [20] восстанавливали дисульфиды опрыскиванием свежеприготовленным 0,4 %-ным раствором борогидрида натрия в 95 %-ном этаноле. Реакцию проводили в течение 15—20 мин, после чего избыток реагента разлагали смесью ледяная уксусная кислота — 6 н. соляная кислота — ацетон (8:2:90).

Кауфман и Хо [21], Кауфман и сотр. [22] и Кнаппе и Петери [23] использовали каталитическое гидрирование непосредственно на пластинке. Для этого на слой наносили каплю 2 %-ного коллоидного раствора палладия, высушивали пластинку в течение часа при 80—90 °С, наносили пробу на участок слоя, содержащий палладий, и гидрировали в течение часа в эксикаторе, заполненном водородом. Кауфман и сотр. [21, 22] таким методом осуществили двумерное разделение трудно разделяющихся пар жирных кислот (рис. 6.1). Эти авторы вначале проводили распределительное хроматографическое разделение в одном направлении, после этого наносили катализатор, гидрировали и вновь проводили распределительное разделение в другом направлении. Уиленд и Оттенхейм [24] для определения структуры аминокислот обрабатывали несколько миллиграммов аминокислоты азидом карбобензилокси-*L*-аминокислоты и удаляли защитную группу гидрированием, для чего пятно пробы смачивали раствором хлорида палладия.

Греф и Хоппе [25], чтобы обнаружить на пластинке нитросоединения, восстанавливали нитрогруппу до аминогруппы, опрыскивая пластинку свежеприготовленным раствором, содержащим смесь 3 мл 15 %-ного раствора хлорида цинка, 15 мл

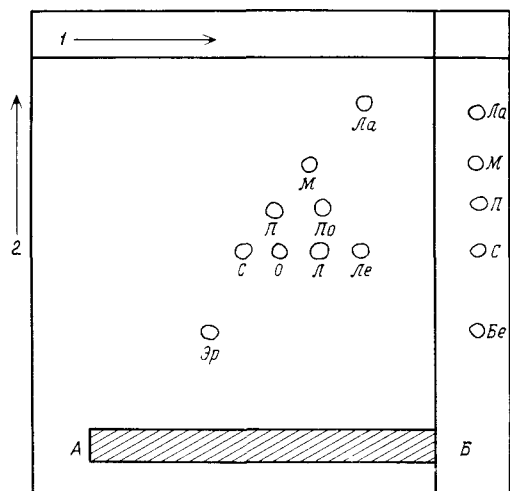


Рис. 6.1. Разделение смеси жирных кислот методом двумерной хроматографии с применением гидрирования на пластинке [9] (с разрешения авторов и Industrieverlag von Harnhaussen K. G).

Адсорбент — кизельгур G, пропитанный ундеканом; растворитель — смесь уксусная кислота—ацетонитрил (3/2), на 80 % насыщенная ундеканом, детектирующий реактив — родамин В. Разделение в поперечном направлении проводилось после гидрирования с использованием коллоидного палладия в качестве катализатора (заштрихованная область). Размер пробы — 5 мкг каждого соединения. Стартовая точка А — лауриновая (Ла), миристиновая (М), пальмитиновая (П), пальмитонловая (По), стеариновая (С), олеиновая (О), линоленовая (Л), линолевая (Ле) и эруковая (Эр) кислоты. Стартовая точка В — лауриновая (Ла), миристиновая (М), пальмитиновая (П), стеариновая (С) и бегеновая (Бе) кислоты.

соляной кислоты и 180 мл воды. Эту реакцию можно также проводить на пластинке перед хроматографическим разделением. Ясуда [26] восстанавливал нитрогруппы путем введения восстановителя (цинка) непосредственно в слой адсорбента. Тоули [27] восстанавливал 3,5-динитробензоаты и 2,4-динитрофенилгидразоны, вводя в слой силикагеля тонкий порошок металлического олова в количестве 5 %. После разделения пластинку помещали в камеру, содержащую пары хлористого водорода. Попытки вводить порошки цинка или олова в слой целлюлозы, предпринятые Бертоном [28], не дали удовлетворительных результатов. Бертон нашел, что при работе с целлюлозой порошок цинка следует напылять на ее поверхность ровным слоем. Этим методом он пользовался для восстановления 3-оксифла-

ванонов. Даже при работе с силикагелем цинк нельзя вводить непосредственно в слой, если для разделения используются кислые элюенты. Однако после разделения цинк можно напылить в виде суспензии в ацетоне. Шутц и Шиндлер [29] восстанавливали нитрогруппы в пестицидах, опрыскивая пластинки кислым раствором хлорида титана (III).

Тайер и сотр. [30] восстанавливали соли тетразолия до окрашенных формазанов, обрабатывая пятно пробы каплей раствора сульфида аммония. Обработанную пластинку нагревали, чтобы испарить избыток реактива. Наряду с парами сульфида аммония использовался также щелочной раствор аскорбиновой кислоты.

Накамура и Тамура [31] восстанавливали S-алкилтиосульфаты и S-арилтиосульфаты (так называемые «соли Банте»), опрыскивая пластинки свежеприготовленным раствором, содержащим 154,2 мг дитиотрепта в 50 мл 0,05 М раствора трисбуфера (рН 9,20) с добавкой 93,1 мг двузамещенной натриевой соли ЭДТА. Соли Банте уже через 5 мин восстанавливались до сероводорода и соответствующих тиолов. Эти же авторы восстанавливали дисульфиды свежеприготовленным 2 %-ным раствором цианида калия в 95 %-ном метаноле. После опрыскивания пластинку оставляли на 5 мин.

Скотни и Трутер [32] восстанавливали 11-β-оксипероксиланостенилацетат до 11-оксоланостенилацетата, опрыскивая пятно пробы на слое силикагеля смесью 5 %-ного водного раствора железных квасцов, метанола и эфира (2:1:1).

3. ДЕГИДРАТАЦИЯ

Терпеновые спирты переводили в углеводороды, нанося на пятно пробы каплю концентрированной серной кислоты, после чего пробу элюировали гексаном. Образовавшиеся в результате реакции углеводороды легко перемещались из реакционной зоны, тогда как кислородсодержащие соединения оставались на месте [1]. Дегидратацию в капиллярах проводили с помощью раствора оксихлорида фосфора в пиридине [15]. Таким же образом использовали комплекс хромовой кислоты с пиридином [33]. Для проведения реакции к смеси 40 мкл безводного пиридина с 4 мг тонкого порошка хромового ангидрида добавляли раствор, содержащий 5 мг исследуемого соединения в 50 мкл безводного пиридина. Смесь выдерживали 12 ч при комнатной температуре, отбирали пробу объемом 10 мкл и наносили ее на хроматографическую пластинку.

Авторы работ [9, 34] показали, что некоторые алкалоиды можно дегидратировать простым нагреванием при 105—120°C непосредственно на пластинке.

4. ГИДРОЛИЗ

Беггиолини и Дьюельд [35] проводили гидролиз эфиров *n*-аминобензойной кислоты и сульфонамидов непосредственно на пластинке, помещая последнюю в атмосферу концентрированных паров соляной кислоты при 100°C. Картниг и Вегшейдер [36] применили аналогичную методику для гидролиза некоторых сапонинов и гликозидов [37]. Гликопептиды гидролизовали 4 н. соляной кислотой непосредственно на хроматографической пластинке при 100—105°C в закрытой камере [38]. Нитрилы гидролизовались с образованием соответствующих аммонийных солей. Для проведения этой реакции пластинку опрыскивали смесью 2 н. раствора серной кислоты с пероксидом водорода (9 : 1), высушивали 40—60 мин на воздухе, покрывали другой стеклянной пластинкой и нагревали 7—8 мин при 120°C. Другой способ гидролиза нитрилов — 12-часовая обработка пластинки парами хлористого водорода при 50°C [40]. Шмид и Менгольд [41] для расщепления альдегидогенных липидов помещали пластинку на 5 мин слоем вниз на чашку с концентрированной соляной кислотой, нагретой до 40—50°C. Вайзанатан и др. [42] использовали этот метод в несколько модифицированном виде для количественного определения альдегидов, выделяющихся из смеси фосфатидов алкенилацил- и диацилэтанолamina. Андерсон и др. [43] исследовали эту реакцию и нашли, что в указанных условиях она проходит не полностью и, чтобы эта реакция прошла до конца, ее следует проводить, встряхивая смесь в пробирке с концентрированной соляной кислотой. Однако совершенно необязательно, чтобы липиды элюировались с силикагеля первыми. Оуэнс [44] провел специфичный гидролиз плазмалогенов до (2-ацил)лизофосфолипидов, опрыскивая пластинку раствором хлорида ртути.

Чтобы расщепить сульфаты стероидов, Пейн и Мейсон [45] выдерживали пластинку 3 ч в парах смеси соляная кислота — диоксан (90 : 10). Хервиц [46] для этой же реакции применял раствор 0,1 мл концентрированной серной кислоты в 9,9 мл диоксана или ацетона. Однако натриевая соль сульфата тестостерона под действием ацетонового раствора не менялась и лишь слегка реагировала с диоксановым раствором. Напротив, натриевая соль сульфата эстрогена полностью гидролизовалась диоксановым раствором; ацетоновый раствор вызывал еще более интенсивный гидролиз. Шутц [47] для одновременного гидролиза и восстановления нитрацепама и его основных метаболитов опрыскивал пластинку раствором хлорида титана (III). После этого слой адсорбента покрывали стеклянной пластинкой и нагревали 10 мин при 100°C. Кертис и Мюллер [48] гидроли-

зовали триметилсилильные эфиры стероидов, опрыскивая пластинку смесью метанол — концентрированная серная кислота (1 : 1).

Карбаматы гидролизовали до соответствующих фенолов, опрыскивая слой 5 %-ным раствором гидроксида калия [49]. Маркус и Ма [50] проводили гидролиз эфиров флавона следующим образом: опрыскивали пластинку 2 н. раствором гидроксида натрия, выдерживали ее 45 мин при комнатной температуре, нагревали 5 мин при 110°C и затем опрыскивали смесью уксусная кислота — вода (1 : 1). Если нужно было гидролизовать сложные эфиры, каплю исследуемой смеси смешивали с каплей раствора гидроксида калия в этиленгликоле (6 г на 100 мл) в маленькой пробирке [51] и нагревали до появления кольца конденсата на холодной части пробирки. Конденсат стряхивали в реакционную смесь центрифугированием и наносили смесь на хроматографическую пластинку. Касс и Матис [9] омыляли алкалоиды, нагревая их в капилляре при 100°C в течение часа с 0,1 н. спиртовым раствором гидроксида калия.

Барни [52] в качестве реагента для гидролиза многих фосфорорганических соединений готовил смесь 11,2 мл 57 %-ной соляной кислоты (не содержащей ингибиторов) с 50 мл ледяной уксусной кислоты и доводил объем смеси водой до 100 мл. Хроматографическую пластинку, опрысканную указанной смесью, выдерживали 15 мин при 250°C. Эскью и др. [53, 54] модифицировали эту методику следующим образом. Перед нагреванием на слой адсорбента накладывали вторую стеклянную пластинку и укрепляли ее зажимами. В этом случае гидролиз можно проводить при более низкой температуре (180°C). Таким методом можно гидролизовать триметил-, триэтил- и трибутилфосфаты, однако трифенил- и трикрезилфосфаты не гидролизуются.

5. ГАЛОГЕНИРОВАНИЕ

Для разделения холестерина и холестерина, содержащихся в смеси стероидов, Каргил [55] подвергал ее бромированию. С этой целью на пятно пробы на пластинке наносили каплю 0,1 %-ного (масса/объем) раствора брома в хлороформе. Количество добавленного брома превышало массу пробы в 2—3 раза. После обработки хроматограммы смесью бензол — этилацетат (2 : 1) холестеранол можно было легко отличить от продуктов бромирования холестерина. С помощью аналогичного метода разделены фенилбутазон и преназон [56]. Авторы работы [57] бромировали пятна пробы в стартовой точке, чтобы разделить и идентифицировать близкие по свойствам барбитураты и тиобарбитураты. Эти же авторы указывают, что во многих случаях

реакции проходят не полностью или имеют место цепные реакции. В результате образуется ряд характерных продуктов, что облегчает идентификацию. Шутц и Шутц [58, 59] разделили барбитураты на группы в соответствии с типом их реакции с бромом. Кауфман и др. [21, 22, 60] использовали несколько иную методику бромирования на пластинках. Анализируя трудно разделяющиеся жирные кислоты, они проводили бромирование непосредственно в процессе разделения. Элюентом в данной ситуации служила смесь уксусной кислоты и ацетонитрила (1 : 1) с добавкой 0,5 % брома.

Копиус Пирбум и Бикс [61] с помощью аналогичного метода отделяли холестерин от близкого по свойствам брассикастерина. Колер и др. [62] этим методом проводили предварительное разделение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот перед газохроматографическим анализом.

Полесук и Ма [63] хлорировали на слое силикагеля ацетанилид, *n*-хлорацетанилид и 2,5-дихлорацетанилид. Пластинку помещали на 20 с в сосуд, заполненный хлором, и выдерживали 5 мин при 60°C в сушильном шкафу с принудительной циркуляцией воздуха. Ацетанилид хлорировался полностью с образованием пяти продуктов, *n*-хлорацетанилид реагировал частично с образованием трех продуктов, а 2,5-дихлорацетанилид реагировал примерно на 50 % с образованием двух полихлорсодержащих соединений.

Уилк и Брилл [64] обрабатывали пятна алкалоидов на хроматографической пластинке парами иода. При этом образовывался ряд производных, и по расположению пятен на пластинке можно было осуществить идентификацию исходных соединений. Уилк и сотр. [10] обрабатывали пластинку с нанесенными на них пробами полядерных ароматических углеводов парами иода в затемненной камере в течение различных промежутков времени (от нескольких минут до нескольких часов) до завершения реакции. О полноте иодирования судили по интенсивности окраски пятен. Далее избыток иода удаляли и элюировали пластинку соответствующим растворителем. Аналогичный метод был использован при анализе ряда ароматических аминов. Шмидт [65] нашел, что из 43 исследованных им фармацевтических препаратов 23 реагировали с иодом непосредственно на пластинке. Уилк и Тауп [66] исследовали процесс дегидратации холестерина, адсорбированного на хроматографических пластинках и обработанного парами иода. Эти авторы выделили пять соединений: производные димера и тримера холестерина, тример, 1-изопропил-4-метилпицен и 10-изопропил-7-11Н-индено-2,1-фенантрен. Браун и Тернер [67] исследовали действие иода на фенольные стероиды, адсорбированные на слое силикагеля. Эстрон давал два соединения —

2-иодэстрон (основной компонент) и 2,4-дииодэстрон. Препаративные исследования показали, что при комнатной температуре иодирование проходит практически полностью за 6 ч. Даже через 20 мин выход основного компонента составлял около 10 %, следовательно, реакция проходит в заметной степени за время, необходимое для образования зон. Полученные результаты показывают, что при количественных исследованиях пользоваться парами иода в качестве детектирующего реактива следует достаточно осторожно. Ацелирование фенольной гидроксильной группы препятствует иодированию ацетата эстрона и его 2-иодпроизводного.

6. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

Рендерат и Рендерат [68] проводили ферментативные реакции непосредственно на слоях целлюлозы-анионита, пропитанной полиэтиленгликолем. Фосфодиэстеразу растворяли в буферном растворе, наносили на пятно цитидиндифосфата глюкозы, покрывали сверху «парафильмом» и оставляли на 45—60 мин при 23 °С. Хроматографическое разделение продуктов реакции показало наличие 5'-монофосфата цитидина и 1-фосфата глюкозы. Дальнейшее расщепление монофосфатов можно было осуществить действием раствора простата фосфомоноэстеразы. При этом образовывались цитидин, ортофосфат и глюкоза.

Чирш и Швабе [69] отделяли сахара и агликоны от смесей гликозидов методом двумерной хроматографии, причем после первого разделения пластинку обрабатывали раствором фермента.

7. ЭТЕРИФИКАЦИЯ

Чтобы увеличить подвижность стероидных сапогенинов, Беннет и Хефтмен [70] этерифицировали три окистероида непосредственно на хроматографических пластинках, обрабатывая их трифторуксусным ангидридом. По окончании этой процедуры пластинку сушили несколько минут под тягой, чтобы удалить образующуюся в процессе реакции трифторуксусную кислоту. Сапогенины можно этерифицировать также и перед нанесением пробы на пластинку. Для этого 2 мл трифторуксусного ангидрида добавляют к 22 мл 0,01—0,1 %-ного раствора сапогенинов, встряхивают в течение минуты и нейтрализуют кислоту, добавляя 1 мл 2 н. водного раствора карбоната натрия. Рисс [71] метилировал фосфорорганические кислоты непосредственно на пластинках эфирным раствором диазометана. Авторы работы [72] аналогичным методом этерифицировали карбоновые кислоты, содержащие пиперидиновое кольцо

Элгеймел и Фейец [73] для той же цели наносили на пластинку 5 %-ный раствор карбоната калия в ацетоне (содержавшем небольшое количество воды). Пластинку высушивали, опрыскивали 50 %-ным раствором метилдида в ацетоне, помещали в камеру, насыщенную парами смеси метилдида—ацетон (1:4), и выдерживали 3 ч при 50°C. Кауфман и др. [74] проводили метанолиз липидов, обрабатывая их 12 %-ным раствором гидроксида калия в метаноле. Васуейнатан и др. [42, 75, 76] модифицировали этот метод для двумерного количественного хроматографического анализа липидов. Эти авторы использовали как кислотный гидролиз, так и метанолиз. Холлоуэй и Чоллен [77] проводили этерификацию, обрабатывая пятна пробы раствором трифторида бора в метаноле с последующим нагреванием пластинки в токе горячего воздуха. Упомянутый реактив можно приготовить [78], барботируя газообразный трифторид бора (фирмы Matheson, Coleman and Bell) под тягой через 1 л метанола, охлаждаемого на ледяной бане. Процесс прекращают, когда после поглощения 125 г трифторида бора из сосуда начинают выделяться белые пары. Полученный реактив можно хранить в течение двух лет. Оэрт и Досс [79] применяли для перэтерификации липидов метилат натрия. Пластинку предварительно элюировали смесью хлороформ—метанол (2:1) для очистки от примесей и после этого активировали при 110°C. После нанесения проб пластинку опрыскивали 2 н. раствором метилата натрия. Реакция проходила за 5 мин. Этим методом пользовались и другие исследователи [80, 81].

Можно также соскоблить пятна разделенных компонентов и метилировать их, не элюируя с адсорбента [82—84]. По-видимому, простейший метод проведения этой операции состоит в том, что адсорбент вместе с адсорбированным исследуемым веществом помещают в смесь этилацетат—метанол (9:1) или диэтиловый эфир—метанол (9:1) и пропускают газообразный диазометан до появления устойчивой желтой окраски [85]. Автор работы [86] этерифицировал жирные кислоты, адсорбированные на силикагеле, нагревая их 30 мин на водяной бане в смеси метанол—бензол—концентрированная серная кислота (345:115:4).

Маркус и Ма [50] ацетилювали флавоны, нагревая их в запаянном капилляре с безводным пиридином и уксусным ангидридом. Касс и Матис [22] для ацетилювания наносили непосредственно на пластинку уксусный ангидрид, а также ацетилхлорид. Для ацетилювания полиглицеринов непосредственно на слое Даллас [87] опрыскивал пластинку 60 %-ным (объем/объем) раствором уксусного ангидрида в безводном пиridине. Опрысканную пластинку покрывали стеклом, переворачивали слоем вниз и нагревали на плитке 15 мин при 95—

100°C. Затем стекло убирали и оставляли пластинку на воздухе на несколько часов с тем, чтобы избыток реактива испарился. Холлоуэй и Чоллен [77] проводили ацетилювание, нанося ацетилхлорид на пятно пробы капиллярной пипеткой. Избыток реактива удаляли током горячего воздуха.

8. НИТРОВАНИЕ

Клесмент [88] нитровал фенолы на слое оксида алюминия, обрабатывая пластинку парами азотной кислоты, или предварительно насыщал слой 5 %-ным раствором нитрита натрия и обрабатывал пластинку парами хлористого водорода. Уилк и др. [10] нитровали полициклические ароматические углеводороды. Для этого пластинку со слоем силикагеля помещали в камеру, содержащую слой пентоксида фосфора, и вводили на пентоксид 2—3 мл концентрированной азотной кислоты. Нитрование проходило полностью за 10 мин. Полесук и Ма [34, 89] проводили нитрование различных соединений путем опрыскивания пластинки 90 %-ным раствором азотной кислоты (избыток кислоты необходимо удалять). Часть пластинки, не содержащую пятен, при опрыскивании закрывали. После опрыскивания пластинку нагревали в сушильном шкафу при 105°C в течение 30 мин.

9. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Существует ряд производных, которые можно получить непосредственно на слое перед разделением [1]. Так, фенилгидразоны можно получить, если добавить к пятну пробы каплю фенилгидразина. То же самое можно проделать с помощью водного раствора гидрохлорида семикарбазида, нейтрализованного гидроксидом натрия. Тамлинсон и др. [90] наносили реактивы на карбонил непосредственно на пластинку, помещенную у выхода газового хроматографа. При этом карбонильные соединения, выходящие из колонки, вступали в реакцию в момент соприкосновения со слоем. Эти авторы использовали раствор 2,4-динитрофенилгидразина в смеси ортофосфорной кислоты с этанолом, а также раствор 0,5 г *n*-нитрофенилгидразина в 30 мл эталона с добавкой 6 мл метилаля и 5 капель концентрированной ортофосфорной кислоты и раствор 2,4-динитрофенилсемикарбазида (0,15 г препарата растворяли в 20 мл кипящего этанола и добавляли 6 капель концентрированной соляной кислоты). В процессе поглощения элюата пятно поддерживали во влажном состоянии. Если объем карбонильного соединения превышал 2 мкл, то использовали два или несколько

пятен, чтобы избежать образования корки продукта и перегрузки адсорбента. Получение производных под действием 2,4-динитрофенилгидразина непосредственно на пластинках описано для фенолальдегидов [91], 14 производных бензальдегида [92] и *n*-бензохинона и его хлорпроизводных [93]. Описано также прямое получение *n*-бромфенациловых эфиров хлорбензойной кислоты [94].

Лизбоа [95] наносил на стартовую точку хроматографической пластинки 0,1 %-ный раствор реактива Жиарда (триметилацетогидразид—хлорид аммония) в 10 %-ном (объем/объем) растворе ледяной уксусной кислоты в метаноле. После этого на пятно наносили кетостероиды и пластинку помещали на 15 ч в камеру, насыщенную парами уксусной кислоты. По окончании обработки уксусную кислоту удаляли, нагревая пластинку 10 мин при 80°C, и элюировали хроматограмму.

Лизбоа и Дикцфейлузи [96] для получения нитропроизводных эстрогенов использовали реакцию Боута [97]. Пятно пробы обрабатывали последовательно парами аммиака и диоксида азота (который получали по реакции между металлической медью и концентрированной азотной кислотой).

Патаки [98] получал динитрофенильные производные аминокислот непосредственно на пластинках перед вторым разделением при двумерной хроматографии. Для этого высушенную пластинку опрыскивали вначале буферным раствором, содержащим 8,4 г бикарбоната натрия и 2,5 мл 1 н. раствора гидроксида натрия на 100 мл раствора, а затем 10 %-ным (масса/объем) раствором фтординитробензола в метаноле. По краям пластинки помещали две полоски полиэтилена, покрывали ее сверху стеклом и полученный таким образом «сэндвич» нагревали в темноте при 40°C в течение часа. Затем охлаждали и помещали на 10 мин в эфирную баню, после чего высушивали. Патаки и сотрудники опубликовали еще две работы [99—100], в которых рассматривается применение этого метода.

Пейриар и др. [101] описали прямое получение *n*-толуолсульфонатов некоторых аминов на слоях различных адсорбентов. Пятна проб обрабатывали раствором реагента в пиридине и пластинки нагревали 4 ч при 60°C.

Майнъярд и др. [102] получали производные спиртов непосредственно на пластинках, помещенных на выходе газового хроматографа. Для этой цели они использовали растворы, содержащие 10 г *o*-нитрофенилизотиоцианата в 100 мл бензола или 1,0 г 3,5-динитробензоилхлорида в 7,5 мл *n*-ксилола с добавкой 1,0 мл тетрагидрофурана. Чтобы получить оптимальные результаты, нужно контролировать температуру продуктов на выходе из газового хроматографа. При использовании динитробензоил-

хлорида оптимальная температура выхода для первичных и терпеновых спиртов составляла 185°C, а для вторичных спиртов 155°C. При использовании *o*-нитрофенилизотиоцианата оптимальные результаты получались при температуре выхода 185°C. При применении динитробензоилхлорида после выхода пика на пятно наносили 10 %-ный раствор гидроксида натрия, чтобы устранить помехи со стороны избытка реагента при последующем элюировании.

Лин и Нарасимахари [103] получали изотиоцианатные производные, опрыскивая пластинки 10 %-ным раствором сероуглерода в этилацетате. После опрыскивания пластинку выдерживали 30 мин в камере, насыщенной парами сероуглерода, опрыскивали смесью метанола с серной кислотой (1:1) и нагревали 10 мин при 100°C.

Накаяма и сотр. [104] описали ультрамикрoанализ белков сыворотки. Объем пробы составлял несколько нанолитров. На точку старта наносили 10 мкл 0,05 %-ного раствора 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлорида в гексане, выпаривали растворитель и на пятно наносили 5—20 нл пробы. Затем пластинку обрабатывали парами буферного раствора, содержащего 0,1 моль/л бикарбоната триэтиламина (рН 8,5). Избыток реактива, побочные продукты реакции и производные низкомолекулярных соединений удаляли со стартовой точки путем последовательного элюирования смесями бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) и изопропанол—метилацетат—28 %-ный раствор аммиака (9:7:4). Производные белков при этом оставались в стартовой точке.

Козн и др. [105] переводили фенолы в динитрофениловые эфиры, опрыскивая пластинки последовательно насыщенным раствором метоксида натрия и 4 %-ным (масса/объем) раствором 1-фтор-2,4-динитробензола в ацетоне. Пластинку покрывали стеклом и нагревали 40 мин при 190°C.

Пржибильски [106] получал производные афлатоксинов В₁ и С₁ непосредственно на хроматографической пластинке, обрабатывая пятна пробы свежеприготовленной смесью трифторуксусная кислота—бензол (1:1). Через 5 мин пластинку высушивали током горячего воздуха (10 мин при 40°C).

Инглис и др. [107] при работе на белковом секвенаторе получали тиазолиноны и переводили их в фенилтиогидантоины, обрабатывая пятна на пластинке гептафтормасляной кислотой. После нанесения кислоты пластинки нагревали 10 мин при 140°C и быстро охлаждали до комнатной температуры. Однако этот метод непригоден для обнаружения треонина, серина, S-карбоксиметилцистеина, триптофана, N^ε-фенилтиокарбамиллизина или глутаминовой кислоты.

10. ПРОЧИЕ РЕАКЦИИ

Моттье [108], исследуя экстракты кислых красителей на пластинках с оксидом алюминия, предварительно наносил в точку старта каплю 1 н. раствора щелочи. После нанесения пробы экстракта пластинку нагревали 3 мин при 104°C, чтобы перевести красители в хроматографируемые соли. Рендерат и Уэймен [109] при разделении дезоксирибонуклеотидов и полирибонуклеотидов на пластинках с полиэтиленминированной целлюлозой наносили в точку старта 0,005 мл раствора полиуридиловой кислоты (6 мг/мл). Полиуридиловая кислота образывала комплексы с комплементарными олигонуклеотидами дезоксиаденозина, в результате чего последние в процессе разделения оставались в стартовой точке. При использовании этой методики необходимо контролировать температуру.

Опубликован ряд работ по анализу неорганических соединений. Зейлер и Каффенбергер [110] наносили на слой силикагеля галогениды в виде солей калия или натрия. При элюировании раствором гидроксида аммония они превращались в аммонийные соли. Таким образом, хлориды, бромиды и иодиды разделялись в виде аммонийных солей. Только фторид оставался в стартовой точке. Зейлер и Ротвейлер [111] наносили в стартовую точку соли щелочных металлов и сильных кислот, а затем ацетат бария. Исходные соли превращались в ацетаты и при последующем элюировании разделялись на пластинке, тогда как барий оставался на месте. Уэйкер и Броссмер [112] нашли, что при элюировании гексоз, пентоз и дисахаридов на пластинках с силикагелем с применением растворителей, содержащих аммиак, образуются аминсахара. По-видимому, это объясняется каталитическим действием силикагеля.

Шталь [113] также проводил химические реакции исследуемых проб непосредственно на пластинках. Он ввел в употребление так называемый метод РРР (разделение — реакция — разделение), в котором реакцию на хроматографической пластинке проводят после первого разделения. Если после второго разделения в поперечном направлении тем же растворителем пятна не располагаются приблизительно по диагонали пластинки, это служит указанием, что анализируемые соединения вступили в реакцию. Шталь продемонстрировал это на примере разделения пиретринов. Пиретрины подвергали УФ-облучению, которое катализировало их окисление.

Пренди [114] дезалкилировал N-алкиламины, нагревая их на пластинках с силикагелем или оксидом алюминия в течение 1—6 ч при 110—160°C. Обычно основными продуктами реакции были продукты дезалкилирования, однако иногда образывались

и другие побочные продукты. При работе с недостаточно чистыми веществами или смесями автор рекомендует двумерное разделение. В этом случае вначале проводят первое разделение, потом дезалкилирование и, наконец, второе разделение. Для обнаружения аминов на хроматографических пластинках иногда используют азотирование или сочетание аминов с фенолами. Маркус и др. [115] предложили эту процедуру в качестве микрометода синтеза красителей. Эти авторы закрывали свободную от пятен пробы часть пластинки и опрыскивали пятна пробы диазотирующим раствором (500 мг нитрита натрия в 50 мл 1 н. раствора соляной кислоты) до полного насыщения слоя. Далее избыток азотистой кислоты удаляли, нагревая пластинку 5 мин при 105°C. После этого пластинку опрыскивали 5 %-ным раствором фенола в метаноле. Те же авторы [116] получали 2,4-динитро-5-аминофенильные производные аминокислот в капиллярах. Реакционную смесь наносили в угол хроматографической пластинки и элюировали соответствующим растворителем. После разделения пластинку высушивали, закрывали неиспользованную часть слоя, опрыскивали 0,1 М раствором гидроксида натрия в метаноле с таким расчетом, чтобы лишь слегка увлажнить поверхность, оставляли на 10 мин и затем опрыскивали свежеприготовленным 0,2 %-ным раствором фторбората *n*-нитробензилдиазония в смеси метанол—вода (1:1) до полного увлажнения слоя. Экран убирали и оставляли пластинку на 15 мин при комнатной температуре. Образующиеся красители разделяли, проводя элюирование в поперечном направлении.

Бирл и сотр. [117] использовали реакции на хроматографической пластинке с фосфорной кислотой для идентификации эпоксидов в неизвестной смеси и для установления строения обнаруженных эпоксидов. На хроматографическую пластинку со слоем силикагеля, промытым эфиром, наносили 5 мкл 10 %-ного водного раствора фосфорной кислоты, высушивали, наносили в ту же точку еще 5 мкл этого раствора и сушили еще 20 мин. Пробы (20—100 мкг) наносили на полученное таким образом пятно, а также на участок слоя, не обработанный фосфорной кислотой. Пластинку сушили в течение часа и проявляли смесью эфир—гексан. Более полярные продукты реакции эпоксидов с фосфорной кислотой оставались возле точки старта, тогда как эпоксиды в необработанной пробе перемещались по слою адсорбента. Строение эпоксидов определяли тем же способом, только на пластинку наносили не более 25—35 мкг вещества и реакцию проводили в течение всего 5 мин. *цис*-Эпоксиды, 1,2-эпоксиды и трехзамещенные эпоксиды за это время успевали прореагировать количественно или почти количественно. *транс*-Изомеры или пространственно-затрудненные

изомеры (с алькильными заместителями в α -положении по отношению к эпоксидной группе) за это время успевали прореагировать лишь частично или в малых количествах. Для обнаружения пятен разделенных компонентов их обрабатывали парами иода и (или) опрыскивали 2 %-ным раствором ацетата меди, содержащим 8 % (об.) ортофосфорной кислоты.

Мур и Бебб [118] использовали хроматографические пластинки с целлюлозой для исследования применяемых в текстильной промышленности веществ, реагирующих с целлюлозой. После нанесения пробы пластинки нагревали (вулканизовали) 5 мин в печи при определенной температуре, элюировали, высушивали на воздухе и опрыскивали соответствующим детектирующим реактивом. Все исследованные соединения требовали вулканизации при 125—175°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 25, 1107 (1953).
2. Mathis C., Ourisson G., J. Chromatogr., 12, 94 (1963).
3. Kofoed J., Fabrierkiewicz C., Lucas G. H. W., J. Chromatogr., 23, 410 (1966).
4. Kofoed J., Fabrierkiewicz C., Lucas G. H. W., Nature, 211, 147 (1966).
5. Ognyanov I., Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 16, 161 (1963).
6. Ognyanov I., Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 16, 265 (1963).
7. Fuhrmann R., Jeralomon D., J. Chromatogr., 22, 468 (1966).
8. Weidemann G., J. Chromatogr., 54, 141 (1971).
9. Frijns J. M. G. J., Pharm. Weekbl. Ned., 106, 605 (1971); through Chem. Abstr., 75, 121441b (1971).
10. Wilk M., Hoppe U., Taupp W., Rochlitz J., J. Chromatogr., 27, 311 (1967).
11. Kaess A., Mathis C., Chromatogr. Electrophor., Symp. Int., 4th 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 525.
12. Rusiecki W., Henneberg M., Ann. Pharm. Fr., 21, 843 (1963).
13. Malins D. C., Mangold H. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 576 (1960).
14. Mangold H. K., Fette, Seifen, Anstrichm., 61, 877 (1959).
15. Hamman B. L., Martin M. M., Steroids, 10, 169 (1967).
16. Gardner A. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54, 517 (1971).
17. Smith L. L., Price J. C., J. Chromatogr., 26, 509 (1967).
18. Van Lier J. E., Smith L. L., J. Chromatogr., 41, 37 (1969).
19. Polesuk J., Ma T. S., J. Chromatogr., 57, 315 (1971).
20. Glaser C. B., Maeda H., Meienhofer J., J. Chromatogr., 50, 151 (1970).
21. Kaufmann H. P., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 81 (1962).
22. Kaufmann H. P., Makus Z., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 1 (1962).
23. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 190, 380 (1962).
24. Wieland T., Ottenheim H., Peptides, Proc. Eur. Peptide Symp., 8th, 1966, North-Holland, Amsterdam, 1967, p. 195.
25. Graf E., Hoppe W., Dtsch. Apoth.-Ztg., 102, 393 (1962).
26. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 13, 78 (1964).
27. Thawley A. R., J. Chromatogr., 38, 399 (1968).
28. Barton G. M., J. Chromatogr., 34, 562 (1968).
29. Schuetz H., Schindler A., Z. Anal. Chem., 270, 356 (1974).
30. Tyrer J. H., Eadie M. J., Hooper W. D., J. Chromatogr., 39, 312 (1969).
31. Nakamura H., Tamura Z., J. Chromatogr., 104, 389 (1975).
32. Scotney J., Truter E. V., J. Chem. Soc. C, 1968, 1911.
33. Schreiber K., Aurich O., Osske G., J. Chromatogr., 12, 63 (1963).
34. Polesuk J., Ma T. S., Mikrochim. Acta, 1970, 677.
35. Baggiolini M., Dewald B., J. Chromatogr., 30, 259 (1967).
36. Kartnig T., Wegschaider O., Planta Med., 21, 144 (1972).
37. Kartnig T., Wegschaider O., J. Chromatogr., 61, 375 (1971).
38. Moczar E., J. Chromatogr., 76, 417 (1973).
39. Eulenhoefer H. G., J. Chromatogr., 36, 198 (1968).
40. Valk G., Peters M., Husung L., Z. Anal. Chem., 249, 245 (1970).
41. Schmid H. H. O., Mangold H. K., Biochim. Biophys. Acta, 125, 182 (1966).
42. Viswanathan C. V., Phillips F., Lundberg W. O., J. Chromatogr., 35, 66 (1968).
43. Anderson R. O., Garrett R. D., Blank M. L., Snyder F., Lipids, 4, 327 (1969).
44. Owens K., Biochem. J., 100, 354 (1966).
45. Payne A. H., Mason M., Anal. Biochem., 26, 463 (1968).
46. Hurwitz A. R., Anal. Biochem., 46, 338 (1972).
47. Schuetz H., J. Chromatogr., 94, 159 (1974).
48. Curtius H.-C., Mueller M., J. Chromatogr., 32, 222 (1968).
49. Ashworth R. J., Sheets T. J., J. Agric. Food Chem., 20, 407 (1972).
50. Marcus B. J., Ma T. S., Mikrochim. Acta, 1969, 815.
51. Redemann C. E., Lucas H. J., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 9, 521 (1937).
52. Barney J. E., II, J. Chromatogr., 20, 334 (1965).
53. Askew J., Ruzicka J. H., Wheals B. B., Analyst (London), 94, 275 (1969).
54. Askew J., Ruzicka J. H., Wheals B. B., J. Chromatogr., 37, 369 (1968).
55. Cargill D. I., Analyst (London), 87, 865 (1962).
56. Schuetz C., Schuetz H., Arzneimittel-Forsch., 23, 428 (1973); through Chem. Abstr., 78, 164161q (1973).
57. De Zeeuw R. A., Wijsbeek J., J. Chromatogr., 48, 222 (1970).
58. Schuetz C., Schuetz H., Arch. Toxikol., 28, 286 (1972).
59. Schuetz C., Schuetz H., Dtsch. Apoth.-Ztg., 113, 1559 (1973).
60. Kaufmann H. P., Wessels H., Das B., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 723 (1962).
61. Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W., J. Chromatogr., 9, 316 (1962).
62. Koehler W. R., Solan J. L., Hammond H. T., Anal. Biochem., 8, 353 (1964).
63. Polesuk J., Ma T. S., Mikrochim. Acta, 1971, 662.
64. Wilk M., Brill U., Arch. Pharm. (Weinheim), 301, 282 (1968).
65. Schmidt F., Krankenhaus-Apoth., 23, 10 (1973); through Chem. Abstr., 79, 45866j (1973).
66. Wilk M., Taupp W., Z. Naturforsch. B, 24, 16 (1969); through Chem. Abstr., 70, 78238y (1969).
67. Brown W., Turner A. B., J. Chromatogr., 26, 518 (1967).
68. Randerath K., Randerath E., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 3, 442 (1964).
69. Tschiersch B., Schwabe K., Pharmazie, 29, 484 (1974).
70. Bennett R. D., Heftmann E., J. Chromatogr., 9, 353 (1962).
71. Riess J., J. Chromatogr., 19, 527 (1965).
72. Maruyama Y., Igaku To Seibutsugaku, 73, 20 (1966); through Chem. Abstr., 69, 92757c (1968).
73. Elgamal M. H. A., Fayez M. B. E., Z. Anal. Chem., 226, 408 (1967).
74. Kaufmann H. P., Radwan S. S., Ahmad A. K. S., Fette, Seifen, Anstrichm., 68, 261 (1966).
75. Viswanathan C. V., Basilo M., Hoebet S. P., Lundberg W. O., J. Chromatogr., 34, 241 (1968).
76. Hoebet S. P., Viswanathan C. V., Lundberg W. O., J. Chromatogr., 34, 195 (1968).
77. Holloway P. J., Challen S. B., J. Chromatogr., 25, 336 (1966).

78. Metcalfe L. D., Schmitz A. A., Pelka J. R., *Anal. Chem.*, **38**, 514 (1966).
79. Oette K., Doss M., *J. Chromatogr.*, **32**, 439 (1968).
80. Viswanathan C. V., Phillips F., Lundberg W. O., *J. Chromatogr.*, **38**, 267 (1968).
81. Saha S., Dutta J., *Lipids*, **8**, 653 (1973).
82. Sammons H. G., Wiggs S. M., *Analyst (London)*, **85**, 417 (1960).
83. Husek P., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **7**, 627 (1969).
84. Цыганов Е. П., Лаб. дело, 1971, 490.
85. Mann J. D., Porter N. G., Lancaster J. E., *J. Chromatogr.*, **92**, 177 (1974).
86. Mancha Perelló M., *Grasas Aceites*, **18**, 231 (1967).
87. Dallas M. S. J., *J. Chromatogr.*, **48**, 225 (1970).
88. Клесмент И. П., Газовая хроматография, № 4, 102 (1966).
89. Polesuk J., Ma T. S., *Mikrochim. Acta*, **1969**, 352.
90. Tumlinson J. H., Minyard J. P., Hedin P. A., Thompson A. C., *J. Chromatogr.*, **29**, 80 (1967).
91. Froment P., Robert A., *Chromatographia*, **4**, 173 (1971).
92. Wilczynska I., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **17**, 21 (1972); through *Chem. Abstr.*, **77**, 42872i (1972).
93. Wilczynska I., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **16**, 69 (1971); through *Chem. Abstr.*, **75**, 5401q (1971).
94. Stedman E. D., *Analyst (London)*, **94**, 594 (1969).
95. Lisboa B. P., *J. Chromatogr.*, **24**, 475 (1966).
96. Lisboa B. P., Diczfalusy E., *Acta Endocrinol.*, **40**, 60 (1962).
97. Boute J., *Ann. Endocrinol.*, **14**, 518 (1953).
98. Pataki G., *J. Chromatogr.*, **16**, 541 (1964).
99. Pataki G., Borko J., Kunz A., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **6**, 458 (1968).
100. Pataki G., Borko J., Curtius H. C., Tancredi F., *Chromatographia*, **1**, 406 (1968).
101. Parihar D. B., Sharma S. P., Tewari K. C., *J. Chromatogr.*, **24**, 443 (1966).
102. Minyard J. P., Tumlinson J. H., Thompson A. C., Hedin P. A., *J. Chromatogr.*, **29**, 88 (1967).
103. Lin R.-L., Narasimhachari N., *Anal. Biochem.*, **57**, 46 (1974).
104. Nakajima T., Endou H., Sakai F., Tamura Z., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **18**, 1935 (1970).
105. Cohen I. C., Norcup J., Ruzicka J. H. A., Wheals B. B., *J. Chromatogr.*, **44**, 251 (1969).
106. Przybylski W., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 163 (1975).
107. Inglis A. S., Nicholls P. W., McK. Strike P., *J. Chromatogr.*, **107**, 73 (1975).
108. Mottier M., *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, **47**, 372 (1956).
109. Randerath K., Weimann G., *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 129 (1963).
110. Seiler H., Kaffenberger T., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1282 (1961).
111. Seiler H., Rothweiler W., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 941 (1961).
112. Weicker H., Brossmer R., *Klin. Wochenschr.*, **39**, 1265 (1961).
113. Stahl E., *Arch. Pharm.*, **293/65**, 531 (1960).
114. Prandi C., *J. Chromatogr.*, **48**, 214 (1970).
115. Marcus B. J., Fono A., Ma T. S., *Mikrochim. Acta*, **1967**, 960.
116. Marcus B. J., Ma T. S., *Mikrochim. Acta*, **1971**, 267.
117. Bierl B. A., Beroza M., Aldridge M. H., *Anal. Chem.*, **43**, 636 (1971).
118. Moore D. R., Babb R. M., *Text Res. J.*, **42**, 500 (1972).

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕСЦВЕТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Обнаружение окрашенных соединений обычно не представляет труда. То же можно сказать о соединениях, флуоресцирующих или фосфоресцирующих при УФ-облучении. В некоторых случаях, если окраска недостаточно интенсивна, можно применить опрыскивание реактивами, увеличивающими чувствительность обнаружения компонентов, что делают, например, при обнаружении окрашенных каротеноидных альдегидов. Уинтерстейн и Хегедус [1, 2] нашли, что чувствительность обнаружения этих соединений можно повысить, если опрыскивать хроматограммы вначале спиртовым раствором роданина, а затем концентрированным водным раствором аммиака или гидроксида натрия.

Существует много реактивов, позволяющих сделать различные бесцветные соединения на хроматограмме видимыми. Эти реактивы можно подразделить на два класса: 1) реактивы общего назначения, позволяющие обнаружить большое число соединений различных типов; 2) более специфичные реактивы, позволяющие обнаружить соединения определенного типа или с определенной функциональной группой. В качестве примера можно привести раствор *o*-дианизидина в ледяной уксусной кислоте, применяемый для обнаружения альдегидов [3].

Опрыскивать пластинки следует из такого распылителя, который дает очень мелкие брызги, при этом реактив покрывает хроматограмму равномерным слоем. Для работы с очень агрессивными реактивами, например с серной кислотой или растворами окислителей, необходимы распылители, изготовленные целиком из стекла. Многие фирмы выпускают распылитель конструкции Морриса [4]. Для работы с менее агрессивными реактивами чрезвычайно удобен пульверизатор, применяемый художниками. У этого пульверизатора сменная насадка, и он обеспечивает любую степень диспергирования жидкости. Кроме того, такой пульверизатор снабжен сменными резервуарами с завинчивающимися колпачками, что позволяет быстро производить опрыскивание различными реактивами. Очень удобна также небольшая чашечка объемом всего в несколько миллилитров. В эту чашечку удобно наливать реактив, а после опрыс-

кивания ее легко ополоснуть и налить другой реактив. Автор данной книги широко пользовался пульверизатором этого типа, даже при работе с такими реактивами, как растворы соляной кислоты и 2,4-динитрофенилгидразина. Если сразу же по окончании распыления промывать пульверизатор небольшим количеством воды или растворителя, то пульверизатор будет пригоден к использованию в течение долгого времени. В продаже имеются также распылители, снабженные резервуаром с фреоном, который служит для распыления реактива, помещаемого в контейнер с завинчивающейся крышкой. Продаются аэрозольные флаконы со многими готовыми реактивами. Однако обычно они распыляют реактив недостаточно тонко [5].

Особенно большие трудности возникают при опылении реактивами незакрепленных слоев адсорбентов. В этом случае приходится держать распылитель на некотором удалении от пластинки, чтобы не сдуть частички адсорбента, и применять минимальное допустимое давление распыляющего воздуха. Работая с такими слоями, применяют также элюирование, в процессе которого детектирующий реактив движется по слою под действием капиллярных сил в направлении, перпендикулярном направлению элюирования хроматограммы [6, 7]. Опрыскивают незакрепленные слои адсорбента и следующим образом: намоченной в реактиве зубной щеткой трут по металлической сетке [8].

1. УНИВЕРСАЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ (РЕАКТИВЫ ОБЩЕГО НАЗНАЧЕНИЯ)

Самым первым и до сих пор широко применяемым реактивом этого типа является концентрированная серная кислота, впервые использованная Кирхнером и сотр. [3]. При обработке пластинки этим реактивом одни соединения становятся видимыми уже на холоду, а другие обнаруживаются лишь при нагревании опрысканной пластинки. Несмотря на агрессивность серной кислоты, она пригодна для работы с пластинками, в которых роль связующего выполняет гипс. При обнаружении особенно химически инертных соединений типа камфоры окисляющую способность серной кислоты увеличивают, добавляя к ней 5 % азотной кислоты. При нагревании пластинки, опрысканной таким реактивом, удается обнаружить весьма инертные соединения. Описаны многочисленные модификации этого метода обнаружения разделенных компонентов. Авторы работ [9—15] использовали 50 %-ную серную кислоту. Лизбоа и Дикифейлузи [16] проводили опрыскивание 2 %-ным раствором серной кислоты в смеси этанол—вода (50:50) с последующим нагреванием пластинки при 100°C. Энтони и Бехер [17] опрыскивали

пластинки свежеприготовленным 15 %-ным раствором концентрированной серной кислоты в безводном *n*-бутаноле (объем/объем) для обнаружения желчных кислот. По окончании разделения пластинки высушивали, опрыскивали указанным реактивом и нагревали 25—30 мин при 110°C, если необходимо обнаружить кислоты с сопряженными двойными связями, и в течение 45—60 мин при обнаружении других свободных кислот. Для той же цели пригодна и смесь серная кислота—уксусный ангидрид, взятых в соотношении 5:95 [17] и 1:4 (реактив Либермана—Бурхарда) [18]. Мацумото [19] опрыскивал пластинки уксусным ангидридом, высушивал их и затем опрыскивал концентрированной серной кислотой.

К серной кислоте добавляют не только азотную кислоту, но и другие окислители: насыщенный раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте [20] или в 80 %-ной серной кислоте [21], раствор 3 г бихромата натрия в смеси 20 мл воды и 10 мл концентрированной серной кислоты [22], насыщенный раствор хромовой кислоты в концентрированной серной кислоте [23] и раствор, содержащий 0,5 г перманганата калия в 15 мл концентрированной серной кислоты (Внимание! Эти вещества можно смешивать только в небольших количествах, поскольку гептоксид марганца взрывоопасен!) [22]. При применении всех этих реактивов пластинки вначале высушивают, чтобы удалить растворитель, опрыскивают реактивом и после этого нагревают, чтобы получить окрашенное или обугленное пятно. Обугленные пятна получают также, опрыскивая пластинки 50 %-ной фосфорной кислотой и затем нагревая их или опрыскивая пластинки концентрированной азотной кислотой [15]. Кроме того, в качестве детектирующих реактивов применяют 25 %-ную [25] и 70 %-ную [6] хлорную кислоту. В последнем случае при разделении витаминов на оксиде алюминия пятна компонентов приобретали характерную окраску уже при комнатной температуре.

Разработан ряд методов, позволяющих обойтись без опрыскивания пластинок агрессивными растворами серной кислоты. Зимински и Боровски [26] использовали 20 %-ный водный раствор сульфата аммония или смеси (1:1) сульфата и бисульфата аммония. При нагревании слоя освобождается серная кислота. Однако в этом случае пластинки нужно нагревать до более высокой температуры, чем при применении серной кислоты. Уокер [27] вводил сульфат аммония непосредственно в слой. Корольчук и Квасниевска [28] с той же целью вводили в слой 1—5 % сульфата меди. Джонс и др. [29] генерировали серную кислоту непосредственно на слое, обрабатывая пластинки парами хлористого сульфурила или триоксида серы и затем водяным паром. Мартин и Аллен [30] сконструировали

приспособление для обработки слоя триоксидом серы в процессе нагревания пластинки. Чтобы обойтись без опрыскивания, можно также пропитать слой перед проявлением 4 %-ным раствором серной кислоты в метаноле [31]. Однако при этом приходится прибегать к таким растворителям, которые не смывают кислоту со слоя. То же самое справедливо при пропитке слоя силикагеля фосфомолибденовой кислотой [32].

В качестве детектирующих реактивов общего назначения пригодны также трихлорид и пентахлорид сурьмы, дающие характерное окрашивание со многими соединениями. Пентахлорид сурьмы используется в виде 10—20 %-ного раствора в четыреххлористом углероде [33], а трихлорид — в виде насыщенного раствора в хлороформе, не содержащем спирта. После опрыскивания одним из этих растворов пластинки нагревают 5—10 мин при 100—120 °С. Рейхельт и Питра [34] применили для той же цели насыщенный раствор трихлорида сурьмы в не содержащем спирта хлороформе с добавкой 20 % уксусного ангидрида.

Другая полезная универсальная реакция обнаружения органических соединений — это флуоресцеин-бромная реакция, позволяющая обнаруживать ненасыщенные соединения и другие соединения, легко реагирующие с бромом. Эта реакция введена в употребление Кирхнером и сотр. [3]. При применении этого метода обнаружения испаряют с пластинки растворитель, опрыскивают ее 0,05 %-ным раствором флуоресцеина и затем обрабатывают парами брома, осторожно вода пластинкой над горлышком сосуда с бромом. При этом флуоресцеин превращается в красный краситель эозин. В местах расположения пятен соединений, поглощающих бром, флуоресцеин сохраняет свою обычную желтую окраску.

Широко применяется в качестве детектирующего реактива общего назначения также иод. Чтобы обнаружить разделенные соединения этим способом, достаточно поместить высушенную хроматографическую пластинку в герметичную камеру, содержащую несколько кристалликов иода [35]. Большинство органических соединений обнаруживается на хроматограмме в виде коричневых пятен. После обработки положения пятен следует отметить, так как они довольно быстро обесцвечиваются. Вместо обработки парами иода можно опрыскать хроматограмму 1 %-ным раствором иода в метаноле или этаноле. Вайль и Нельсон [36] осаждали тонкую пленку иода на стекле и переводили с последнего иод на хроматографический слой.

Котгрейв и Лайнс [37] предложили метод детектирования разделенных соединений на узких хроматографических пластинках: они подвергали эти соединения пиролизу непосредственно на хроматограмме и детектировали продукты пиролиза

с помощью пламенно-ионизационного детектора. Разработаны также различные модификации этого метода. Авторы работы [38] применяли проволоку, покрытую адсорбентом [38]; в работе [39] слой кремневой кислоты в смеси с оксидом меди наносили на внутреннюю поверхность стеклянных трубок; применялись также стержни из пористого стекла, содержащего силикагель [40]. Более подробно этот метод рассмотрен в разделе, посвященном количественному анализу (гл. XI, разд. 7).

Удобным методом обнаружения разделенных соединений, в особенности в количественном анализе, является опрыскивание слоя водой [41—43]. Хроматограмму опрыскивают водой до тех пор, пока слой не станет полупрозрачным. При этом нерастворимые в воде соединения образуют непрозрачные белые пятна на темном фоне.

Весьма перспективным общим методом обнаружения различных соединений представляется метод, предложенный Хейдбринком [44]. Проявленную и высушенную хроматограмму подвергают действию ряда газов и паров (иода, брома, хлора, формальдегида и диоксида азота), а затем проводят пиролиз. Пластинку обрабатывают одним из перечисленных газов в течение 1—2 мин, после чего кладут на блок из алюминия или нержавеющей стали и нагревают сверху электрическим нагревателем со спиралью, закрытыми кварцевой пластинкой для защиты от коррозии. Таким образом можно нагреть пластинку до 800—900 °С, не опасаясь, что стеклянная подложка лопнет. Чтобы убедиться, что реакция прошла до конца, пластинку нагревают не менее 15 мин. Многие соединения при этом образуют пятна различной окраски. Соединения, которые в обычных условиях легко испаряются с пластинки, при применении описанного метода остаются на слое и дают окрашенные пятна. Если неизвестно, дает ли соединение окрашенные продукты хотя бы с одним из пяти применяемых реагентов, можно провести реакцию отдельно с каждым из них.

Конвей и сотр. [45] разработали метод обнаружения летучих продуктов гидролиза на хроматографической пластинке. После разделения слой опрыскивают гидролизующим реактивом и покрывают тонкой полиэтиленовой пленкой (пригодны пленки для упаковки продуктов Handi-Wrap и Cut-Rite Wrap). Сверху накладывают лист фильтровальной бумаги, пропитанный детектирующим реактивом, и стеклянную пластинку, которую закрепляют резиновыми кольцами. Полученный таким образом пакет нагревают 20 мин. В описанном примере хлормезанон гидролизovali 2 н. раствором гидроксида натрия при 50 °С, а детектирующим реактивом служил 0,1 н. раствор *n*-толуолсульфоновой кислоты в метилцеллозольве с добавкой 0,5 % динитрофенилгидразина. Выделившийся *n*-хлорбензальдегид

диффундировал сквозь мембрану и образовывал на бумаге желтые пятна гидразона. При последующем опрыскивании бумаги 2,5 %-ным раствором гидроксида тетраметиламмония интенсивность окраски пятен повышалась. При обнаружении аммиака, образующегося при гидролизе β -оксипропионамида, мембрану заменяли на лист полиэтилена толщиной 1,13 мм, в котором были пробиты отверстия диаметром 1,6 мм, чтобы аммиак проходил сквозь лист. Гидролиз проводили при 100°C, а в качестве детектирующего реактива использовали реактив Несслера. В обоих случаях предел обнаружения составлял 3 мкг вещества.

Смит [45а] разработал метод возбуждения флуоресценции для количественного определения органических соединений на тонкослойных пластинках, а Сегура и Готто [45б] модифицировали этот метод (см. разд. 1 гл. XI). Шенфельд и др. [45в, 45г] исследовали область применения упомянутого метода, в котором пластинку обрабатывают электрически активированными газами, а затем парами карбоната аммония при 130°C. Таким путем удается возбудить флуоресценцию соединений, адсорбированных на хроматографических пластинках. Метод пригоден только для слоев, закрепленных на пористом стекле. Неизвестно, как влияют на описанную процедуру используемые для детектирования растворители, так как операция разделения была исключена и опыты ставились на пятнах, только нанесенных на пластинки. Метод весьма интересен, и несомненно имеет смысл продолжить эксперименты в этом направлении.

2. СЛОИ С ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИМИ ДОБАВКАМИ

Другим полезным методом обнаружения соединений на хроматограммах, предложенным Кирхнером и сотр. [3, 46], является применение флуоресцирующих слоев. Под действием УФ-облучения такой слой ярко флуоресцирует. Если же на слое присутствуют соединения, поглощающие в УФ-области, то они обнаруживаются в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне. Чтобы получить флуоресцирующий слой, к адсорбенту добавляют по 1 % каждого из флуоресцирующих неорганических соединений, использовавшихся Сизе [47, 48] в колоночной хроматографии, а именно сульфида цинка (№ 62 Du Pont) и силиката цинка (№ 609 той же фирмы). Рейтсема [49] предложил в качестве флуоресцентной добавки родамин 6G, а Шталь [50] готовил суспензии адсорбентов в 0,04 %-ном водном растворе флуоресцеина. Однако до сих пор лучшие результаты были получены с неорганическими флуоресцирующими добавками. В некоторых случаях флуоресцирующие реагенты

напыляют на готовую хроматограмму. Для этой цели, в частности, используют водные растворы флуоресцеина натрия [51], 0,005—0,01 %-ные растворы морина в метаноле [52], 0,2 %-ный раствор 2',7'-дихлорфлуоресцеина в этаноле [23] и 0,2 %-ный водный раствор родамина В. В последнем случае толщина слоя адсорбента не должна превышать 0,35—0,5 мм [53].

3. СПЕЦИФИЧНЫЕ ДЕТЕКТИРУЮЩИЕ РЕАКТИВЫ

В разделе, посвященном практическому применению ТСХ, приведены некоторые реактивы, используемые для обнаружения соединений различных типов.

Реактивы на индивидуальные соединения и на отдельные классы соединений

- T-1. Фиолетовый кислый (виолуровая кислота)
Реактив. 1,5 %-ный раствор фиолетового кислого (температуру раствора при приготовлении не следует поднимать выше 60°C).
Методика. Опрысканную хроматограмму нагревают 20 мин при 100°C.
Применение. Обнаружение щелочных и щелочноземельных металлов [54].
- T-2. Ализарин
Реактив. Насыщенный раствор ализарина в спирте.
Методика. Опрыскивают пластинку сначала раствором реактива, затем 25 %-ным раствором гидроксида аммония. Для ослабления фона можно применить еще одно опрыскивание (ледяной уксусной кислотой).
Применение. Обнаружение неорганических ионов, в том числе ионов бария, кальция, магния, алюминия, титана, железа, цинка, лития, тория, аммония, селена, серебра, ртути, свинца, меди, кадмия, висмута, хрома, марганца, кобальта, никеля, галлия, индия, бериллия, циркония, церия, скандия, палладия, платины, урана и редкоземельных элементов (пятна окрашены в цвета от фиолетового до красного) [55].
- T-3. Амидный черный
Реактив. Насыщенный раствор амидного черного 10В в смеси метанол—вода—уксусная кислота взятых в соотношении 5:5:1.
Методика. 1) *Крахмальный гель.* Погружают пластинку в реактив на 30 с, после чего четырежды промывают в свежих порциях растворителя (каждый раз по одной минуте) [56].

- 2) *Агар*. Тщательно высушивают пластинку, погружают в реактив на 30 мин, а далее промывают трижды в свежих порциях растворителя (10 мин, 2 ч и 30 мин) [57].
Применение. Окрашивание пятен на электрофореграммах сыворотки.
- Т-4. Амидный черный
Реактив. 0,5 %-ный раствор амидного черного 10В в 5 %-ной уксусной кислоте.
Применение. Обнаружение пятен белков на агаровом геле [58].
- Т-5. *n*-Аминобензойная кислота
Реактив. 5 %-ный раствор *n*-аминобензойной кислоты в метаноле. Свежеприготовленный хлорциан: смешивают 20 мл 28 %-ной суспензии хлорамина в воде, 20 мл 1 н. соляной кислоты и 10 мл 10 %-ного раствора цианида калия (**Осторожно:** яд!).
Методика. Опрыскивают хроматограмму аминокислотой и обрабатывают парами хлорциана.
Применение. Обнаружение никотиновой кислоты (красное пятно) [59]. Амид никотиновой кислоты дает оранжево-красное пятно.
Предел обнаружения: 0,1 мкг никотиновой кислоты.
- Т-6. *n*-Аминодиэтиланилин—диоксид серы
Реактив. Раствор 0,5 % *n*-аминодиэтиланилина и диоксида серы в 5 %-ном растворе бикарбоната натрия [60].
Методика. Опрыскивают пластинку и оставляют на ночь.
Применение. Обнаружение Δ^4 -3-кето- C_{21} -стероидов.
- Т-7. *o*-Аминодифенил—ортофосфорная кислота
Реактив. Раствор 0,3 г *o*-аминодифенила + 5 мл ортофосфорной кислоты (d 1,88) в 95 мл этанола.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 15—20 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение углеводов (коричневые пятна) [61, 62].
Предел обнаружения: 0,1 мкг.
- Т-8. Аминоэтилдифенилборная кислота
Реактив. Раствор 1 г 2-(аминоэтил)дифенилборной кислоты в 100 мл смеси метанол—пропанол (1 : 1).
Методика. Опрыскивают пластинку и рассматривают в видимом и УФ-свете.
Применение. Обнаружение антоцианидинов, флавонолов, флавонов, гликофлавонов, окси- и метоксикоричных кислот [63].
Предел обнаружения: 1,0 мкг.
- Т-9. Аминогуанидин—бихромат
Реактив. а) Раствор 2,5 г моногидрата сульфата аминоксидина в 100 мл воды. Стабилен при комнатной температуре.
 б) 1 мл 1 %-ного водного раствора бихромата калия смешивают со 100 мл концентрированной серной кислоты. Раствор стабилен в течение месяца.
Методика. Пластинку высушивают и опрыскивают сначала реактивом а), затем реактивом б) и нагревают 10 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение сахаров (голубые или серо-голубые пятна). Фукоза дает сиреневое пятно, β -D-галактуроновая кислота—фиолетовое пятно, но с другим R_f [64].
Предел обнаружения: 0,1 мкг.
- Т-10. *n*-Аминогиппуровая кислота
Реактив. а) 0,3 %-ный раствор *n*-аминогиппуровой кислоты в этаноле.
 б) То же, что и а), но с добавкой 3 % фталевой кислоты.
Методика. Пластинку высушивают на воздухе и опрыскивают реактивом а) для обнаружения гексоз и пентоз или реактивом б), если в смеси присутствуют сахаровосстановители. После опрыскивания нагревают 8 мин при 140°C. На пластинке образуются оранжевые пятна.
Применение. Обнаружение сахаров [65, 66].
Предел обнаружения: 1 мкг при рассматривании в УФ-свете.
- Т-11. *o*-Аминофенол
Реактив. 1 %-ный раствор *o*-аминофенола в метаноле + 10 мл фосфорной кислоты + 5 мл воды.
Методика. Опрыскивают пластинку и нагревают 10 мин при 110—120°C.
Применение. Обнаружение аminosахаров [67].
- Т-12. Нитрат аммония-церия(IV)
Реактив. а) 1 %-ный раствор нитрата аммония-церия(IV) в 0,2 н. азотной кислоте.
 б) 1,5 г дигидрохлорида *N,N'*-диметил-*n*-фенилендиамина растворяют в смеси 128 мл метанола, 25 мл воды и 1,5 мл уксусной кислоты.
 в) 25 %-ный раствор *N,N,N',N'*-тетраметил-4,4'-диаминодифенилметана в ацетоне [68].
Методика. 1) Опрыскивают пластинку свежеприготовленной смесью растворов а) и б) (1 : 1) и нагревают 5 мин при 105°C.
 2) опрыскивают пластинку свежеприготовленной смесью растворов а) и в) (1 : 1) и нагревают 5 мин при 105°C.

- Применение.** Обнаружение полиспиртов 1) желто-зеленые пятна на красном фоне или 2) белые или бледно-голубые пятна на голубом фоне.
- T-13. Нитрат аммония-церия (IV)
Реактив. 6 %-ный раствор нитрата аммония-церия (IV) в 2 н. азотной кислоте.
Методика. Сушат хроматограмму 5 мин при 105°C. Перед опрыскиванием охлаждают.
Применение. Обнаружение полиспиртов (коричневые пятна на желтом фоне) [68].
- T-14. Молибдат аммония—медь
Реактив. 0,08 г металлической меди добавляют к 1 мл воды, содержащей 0,25 г молибдата аммония. Охлаждают, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, тщательно перемешивают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре, время от времени помешивая. Удаляют из раствора медь и добавляют еще 3,2 мл концентрированной серной кислоты.
Методика. Опрыскивают пластинку реактивом и нагревают 5 мин при 65—70°C, снова опрыскивают и выдерживают при той же температуре еще 5—6 мин.
Применение. Обнаружение фосфолипидов (синие пятна на светло-голубом фоне) [69].
Предел обнаружения: 1 мкг лецитина.
- T-15. Молибдат аммония—хлорная кислота
Реактив. 3 г молибдата аммония растворяют в смеси 25 мл воды, 30 мл 1 н. соляной кислоты и 15 мл 60 %-ной хлорной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку сушат 20 мин при 105°C.
Применение. Реактив на липиды [70] (сине-черные пятна), гексозо- и триозофосфаты [71] (пятна видны также в УФ-свете)
- T-16. Молибдат аммония (реактив Хейнса—Ишервуда [72])
Реактив. 0,5 г тетрагидрата молибдата аммония растворяют в смеси 5 мл воды, 1,5 мл соляной кислоты и 2,5 мл хлорной кислоты. После охлаждения доводят объем раствора ацетоном до 50 мл. Раствор готовят за сутки перед использованием. Стабилен примерно 3 недели.
Методика. Опрысканную пластинку помещают под инфракрасную лампу на расстоянии ~30 см от нее, выдерживают 2 мин, после этого облучают 7 мин длинноволновым УФ-светом (360 нм).
Применение. Обнаружение фосфорорганических пестицидов [73], моно- и дифосфорных кислот [74].

T-17. Молибдат аммония—бензидин

- Реактив.** а) Растворяют 2,0 г молибдата аммония в минимальном количестве 1 М соляной кислоты и доводят объем раствора до 100 мл. Реактив стабилен в течение нескольких месяцев.
 б) Растворяют 0,050 г бензидина в 10 мл уксусной кислоты при перемешивании и при добавлении минимального количества воды. Добавляют 22,5 г тригидрата ацетата натрия и доводят объем раствора до 100 мл. Реактив стабилен в течение по меньшей мере двух недель.
 в) Смешивают 11,2 мл 57 %-ной хлорной кислоты (не содержащей ингибиторов) и 50 мл уксусной кислоты и доводят объем раствора до 100 мл. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев.
 г) Растворяют 5,7 г персульфата аммония в минимальном количестве воды и доводят объем раствора водой до 100 мл. Раствор стабилен в течение одного дня.
- Методика.** 1) Опрыскивают пластинку раствором в) и нагревают таким образом, чтобы температура поверхности через 15 мин достигла 250°C. Охлаждают, опрыскивают раствором а) и через 3 мин раствором б). Фосфатные и тиофосфатные пестициды и родственные фосфорные кислоты дают голубые пятна на белом фоне.
 2) Опрыскивают пластинку раствором в) и нагревают так же, как в 1). Охлаждают, опрыскивают раствором а) и через 3 мин раствором б). Фосфонатные и фосфатные пестициды, родственные тиосоединения и фосфорные кислоты дают голубые пятна на белом фоне. Ортофосфаты обнаруживаются обоими описанными методами, однако они дают голубые пятна и без применения реактива в). Органические фосфонаты первым методом обычно не обнаруживаются.
Применение. Обнаружение фосфорорганических соединений [75].
Предел обнаружения: <1 мкг.
- T-18. Молибдат аммония—щавелевая кислота—хлорид олова (II)
Реактив. а) 1 %-ный раствор молибдата аммония в 0,125 М серной кислоте.
 б) Насыщенный раствор щавелевой кислоты.
 в) 1 %-ный раствор хлорида олова (II) в 10 %-ной соляной кислоте.
Методика. Опрыскивают пластинку последовательно растворами а), б) и в).
Применение. Специфичное обнаружение силикатов [76].
Предел обнаружения: 0,006 мкг кремния.

Т-19. Молибдат аммония—хлорид олова (II)

Реактив. Растворяют 2 г молибдата аммония ($\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) в 20 мл смеси воды с соляной кислотой (1:1) при слабом нагревании, затем доводят объем раствора до 100 мл. Раствор стабилен в течение нескольких недель.

б) Растворяют 1 г хлорида олова ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) при нагревании в 10 мл соляной кислоты и добавляют 40 мл воды и 50 мл ацетона.

в) Смешивают 25 мл иодной кислоты ($d=1,7$), 25 мл уксусной кислоты и 50 мл воды.

Методика. При детектировании фосфатов и фосфитов опрыскивают пластинку раствором а), высушивают и опрыскивают раствором б). При обнаружении фосфорорганических пестицидов и других соединений, которые необходимо гидролизовать, опрыскивают сухую пластинку раствором в), покрывают стеклом, нагревают 30 мин при 180°C , опрыскивают раствором а) и снова нагревают 5 мин. Охлаждают, опрыскивают раствором б), помещают в камеру, заполненную парами аммиака, и выдерживают до обесцвечивания фона. Вещества обнаруживаются в виде голубых пятен.

Применение. Обнаружение ионов фосфата и фосфита [77], фосфорорганических пестицидов [78].

Предел обнаружения: 1 мкг пестицидов.

Т-20. Тиоцианат аммония—сульфат железа (II)

Реактив. а) Раствор 0,2 г тиоцианата аммония в 15 мл ацетона.

б) 4 %-ный раствор сульфата железа (II).

Методика. 10 мл раствора б) добавляют к раствору а) непосредственно перед опрыскиванием.

Применение. Обнаружение пероксидов [50]. Немедленно после опрыскивания появляются коричневато-красные пятна.

Т-21. Ванадат аммония (реактив Менделина)

Реактив. 1 г ванадата аммония добавляют к 100 мл концентрированной серной кислоты. Перед употреблением энергично встряхивают.

Методика. После опрыскивания отмечают появление окрашенных пятен и после этого нагревают до 85°C .

Применение. Обнаружение антигистаминов [79].

Т-22. Ванадат аммония—серная кислота

Реактив. а) Растворяют 1,62 г безводного ванадата аммония* в 125 мл концентрированной серной кислоты,

* Соль дважды перекристаллизовывают из 5 %-ного раствора аммиака, промывают холодным абсолютным этанолом и безводным эфиром и сушат 2 ч в вакууме при $135\text{--}140^\circ\text{C}$.

охлаждают и приливают раствор к 125 мл ледяной воды.

б) Разбавляют раствор а) в 10 раз в количестве, необходимом для опрыскивания.

Методика. Опрыскивают пластинку раствором б) и нагревают 3 мин при 110°C .

Применение. Обнаружение стероидов, алкалоидов, производных фенолов [80].

Предел обнаружения: в интервале от 0,25 до 2,5 мкг для различных соединений.

Т-23. Анилинфосфат

Реактив. 20 мл анилина добавляют к 200 мл воды, затем последовательно приливают 180 мл уксусной кислоты и 10 мл фосфорной кислоты. Смесь хранят при 4°C .

Методика. Для опрыскивания применяют смесь 2 частей реактива с 3 частями ацетона. Опрысканную пластинку нагревают 2—5 мин при 100°C .

Применение. Обнаружение углеводов. Пентозы дают красно-коричневые, а альдозы и сорбозы — желтые или желто-коричневые пятна.

Т-24. Анилинфталат

Реактив. 0,93 г анилина и 1,66 г фталевой кислоты растворяют в 100 мл влажного бутанола [81].

Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 105°C .

Применение. Обнаружение сахаров-восстановителей [82, 83].

Т-25. *n*-Анисовый альдегид

Реактив. Свежеприготовленный раствор 0,5 мл *n*-анисового альдегида в смеси 5 мл 70 %-ной хлорной кислоты, 10 мл ацетона и 40 мл воды.

Методика. Опрысканную пластинку нагревают 4—5 мин при $75\text{--}80^\circ\text{C}$. Пятна видны в течение часа при рассматривании в видимом и УФ-свете.

Применение. Обнаружение гликозидов дигиталиса [84].

Предел обнаружения: 0,1 мкг в видимом свете, 0,02 мкг в УФ-свете.

Т-26. Анисовый альдегид (модифицированный реактив Кейги—Мишлера)

Реактив. 0,5 мл анисового альдегида растворяют в смеси 1 мл серной кислоты и 50 мл ледяной уксусной кислоты.

Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 125°C .

Применение. Обнаружение желчных кислот [85] и других стероидов [86].

Предел обнаружения: 1 мкг.

- T-27. Анисовый альдегид**
Реактив. Смешивают 1 мл анисового альдегида с 9 мл 95 %-ного этанола, охлаждают на ледяной бане и добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 90°C.
Применение. Обнаружение простагландинов, сахаров.
Предел обнаружения: 0,1 нмоль (0,05 мкг).
- T-28. Анизидинфталат**
Реактив. Раствор, содержащий 0,1 моль/л *n*-анизидина и фталевой кислоты в 96 %-ном этаноле.
Применение. Обнаружение сахаров [87]. Гексозы дают зеленые пятна, пентозы — красно-фиолетовые, метилпентозы — желто-зеленые, уроновые кислоты — коричневые.
Предел обнаружения: 0,5 мкг метилпентоз и гексоз, 0,1—0,2 мкг пентоз и уроновых кислот.
- T-29. Антрон**
Реактив. а) 10 %-ная серная кислота.
 б) 1 %-ный (масса/объем) раствор антрона в бензоле.
Методика. Опрыскивают пластинку сначала раствором а), затем раствором б) и нагревают 10 мин при 100°C. Окраска нестабильна и исчезает при охлаждении, однако при повторном нагревании снова появляется.
Применение. Обнаружение цереброзидов. Другие липиды не мешают обнаружению [88].
- T-30. Пентахлорид сурьмы**
Реактив. 10—20 %-ный раствор пентахлорида сурьмы в четыреххлористом углероде [33].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают до 120°C и рассматривают в видимом и УФ-свете.
Применение. Детектирующий реактив общего назначения.
- T-31. Трихлорид сурьмы (реактив Карра—Прайса)**
Реактив. Насыщенный раствор трихлорида сурьмы в хлороформе, не содержащем спирта.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 100°C.
Применение. Детектирующий реактив общего назначения, дающий окрашенные соединения со многими соединениями.
- T-32. Трихлорид сурьмы—уксусный ангидрид**
Реактив. Насыщенный раствор трихлорида сурьмы в не содержащем спирта хлороформе с добавкой 20 %-ного уксусного ангидрида [34].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5—10 мин при 130°C.
Применение. Обнаружение стероидов.

- T-33. Трихлорид сурьмы—тионилхлорид**
Реактив. Насыщенный раствор трихлорида сурьмы в не содержащем спирта хлороформе с добавкой 10 % тионилхлорида [89].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают до 110—120°C.
Применение. Обнаружение стероидов, содержащих двойную связь Δ^4 .
- T-34. Реактив Бима [90]**
Реактив. 5 %-ный раствор гидроксида калия в 99 %-ном этаноле.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5 мин при 105°C.
Применение. Каннабидиоловая кислота и каннабидиол (сине-фиолетовые пятна) [91].
- T-35. Бензидин**
Реактив. 0,2 %-ный раствор бензидина в уксусной кислоте.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 100°C.
Применение. Обнаружение альдоз [92]. Моноальдозы дают коричневые пятна. Для обнаружения хлорированных пестицидов опрыскивают пластинки 0,1 %-ным раствором реактива и затем 5—10 с облучают коротковолновым УФ-светом. На кремовом фоне проявляются пятна с окраской от желто- до сине-зеленой [93].
Предел обнаружения: от 0,5 до 1 мкг пестицидов.
- T-36. Тетраазотированный бензидин [94]**
Реактив. а) 5 г бензидина растворяют в 14 мл соляной кислоты и доводят объем раствора до 1 л (раствор стабилен в течение недели).
Методика. Незадолго перед опрыскиванием смешивают равные объемы растворов а) и б). Смесь стабильна 2—3 ч.
Применение. Обнаружение фенолов. Соединения типа флороглюцина или резорцина образуют красные азокрасители.
Предел обнаружения: от 2 до 3 мкг.
- T-37. Бензидин—иодид калия**
Реактив. а) Свежеприготовленный раствор 5 мл продажного отбеливателя в 50 мл бензола.
 б) Раствор 0,5 г бензидина и одного кристалла иодида калия в 50 мл 50 %-ного этанола; фильтруют и хранят при рассеянном свете. Раствор стабилен 2 ч.
Методика. Высушенную хроматограмму опрыскивают раствором а), высушивают, чтобы удалить избыток хлора, и после этого опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение сфинголипидов [95] (голубые пятна).

Предел обнаружения: 5—10 мкг.

Т-38. Бензидин: краситель для крахмальных гелей [96]

Реактив (все растворы готовят на дистиллированной воде).

а) Ацетатный буферный раствор, 0,1 М, рН 4,7.

б) Растворяют 1 г дигидрохлорида бензидина и 1 г нитропруссид натрия при комнатной температуре в 500 мл 1 %-ного водного раствора уксусной кислоты; раствор перемешивают магнитной мешалкой. рН полученного раствора составляет приблизительно 2,8. Раствор готовят ежедневно. Реактив светочувствителен.

в) Свежеприготовленный 3 %-ный водный раствор пирофосфата натрия (рН 10,3).

г) Готовят водный раствор, содержащий 15 % (объемных) глицерина и 2 % (объемных) уксусной кислоты. Непосредственно перед использованием растворяют нитрат натрия из расчета 10 г нитрата на 1000 мл раствора.

Методика. 1) Перед использованием выдерживают гель 20 мин в растворе а), причем через 10 мин раствор меняют.

2) Непосредственно перед использованием к 100 мл раствора красителя б) добавляют 0,2 мл 30 %-ного пероксида водорода и погружают гель в полученный раствор на 7 мин.

3) Тщательно удаляют раствор красителя и выдерживают гель 5 мин в 3 %-ном растворе пирофосфата натрия. Осторожно очищают поверхность геля от сероватого осадка, причем удаляют также все бумажные полоски, если они были использованы для нанесения пробы.

4) Погружают гель на 4 мин в абсолютный метанол.

5) Чтобы удалить метанол, промывают гель 30 мин в большом количестве дистиллированной воды, меняя воду через каждые 15 мин.

6) Погружают гель на 30 мин в раствор г).

7) Сушат гель на стеклянной пластинке в токе теплого воздуха при температуре не выше 50°C в течение 48—72 ч. При этом гель должен быть обращен рабочей поверхностью к поверхности стекла и покрыт сверху подложкой. В течение первых нескольких часов сушки края геля поднимают.

Т-39. Реактив Байлса

Реактив. 40,7 мл концентрированной соляной кислоты, 0,1 г орсины и 1 мл 1 %-ного раствора хлорида железа (III) растворяют в 50 мл воды [97].

Методика. Хроматограмму выдерживают 1,5 ч в парах хлористого водорода при 80°C, после чего опрыскивают реактивом и вновь нагревают при 80°C до полного развития окраски.

Применение. Обнаружение гликолипидов [70] (фиолетовые пятна на белом фоне).

Т-40. Реакция Боута [98]

Реактив. Диоксид азота (получается при взаимодействии концентрированной азотной кислоты с металлической медью).

Методика. Пластинку обрабатывают последовательно парами аммиака и диоксидом азота.

Применение. Обнаружение фенольных ОН-групп [16, 99] (желтое окрашивание, стабильное в течение нескольких дней).

Т-41. Бриллиантовый зеленый

Реактив. 0,5 %-ный раствор бриллиантового зеленого в ацетоне.

Методика. Сухую пластинку опрыскивают реактивом и немедленно обрабатывают парами брома.

Применение. Обнаружение триазиновых гербицидов [100] (темно-зеленые пятна на бесцветном фоне), фосфорорганических соединений.

Т-42. Бромкрезоловый зеленый

Реактив. 0,3 %-ный раствор бромкрезолового зеленого в 80 %-ном (по объему) метаноле с добавкой 8 капель 30 %-ного раствора гидроксида натрия на 100 мл раствора.

Применение. Обнаружение кислот [3] (желтые пятна на зеленом фоне).

Т-43. Бромкрезоловый пурпурный

Реактив. Раствор 0,04 г бромкрезолового пурпурного в 100 мл 50 %-ного этанола. рН раствора доводят щелочью до 10,0.

Применение. Обнаружение галогенид-ионов (кроме фторида) [101], дикарбоновых кислот [102] (желтые пятна на голубом фоне) и гербицидов (галогензамещенные феноксикислоты) [103].

Предел обнаружения: от 1,0 до 2,0 мкг гербицидов.

Т-44. Бром—хлорид железа (III) — сульфосалициловая кислота [90, 104].

Реактив. а) 0,1 %-ный раствор хлорида железа (III) в 80 %-ном этаноле.

б) 1 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты в 80 %-ном этаноле.

Методика. Пластинку обрабатывают 10 мин парами брома, опрыскивают раствором а), сушат на воздухе 15 мин, после чего опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение фосфорорганических соединений и тиофосфатов [105], пестицидов (белые пятна на розовато-лиловом фоне).

Предел обнаружения. 5 мкг.

Т-45. Бром—иодид калия

Реактив. 2 %-ный раствор иодида калия в воде.

Методика. Вещества разделяют на слое адсорбента, содержащем 1,5 г амилопектина в 28,5 г силикагеля G. После элюирования пластинку сушат 10 мин при 100°C, охлаждают и обрабатывают 3 с парами брома. Избыток брома удаляют, обдувая пластинку потоком холодного воздуха в течение 2 мин. Затем опрыскивают раствором иодида калия.

Применение. Обнаружение нитрофенолов и галогензамещенных фенолов (темно-синие пятна) [106].

Предел обнаружения: 0,025—0,1 мкг.

Т-46. Бромсукцинимид—флуоресцеин

Реактив. а) Раствор 0,4 г N-бромсукцинимиды в 100 мл уксусной кислоты.

б) Раствор 0,01 г флуоресцеина в 100 мл 96 %-ного этанола.

Методика. Опрыскивают пластинку раствором а), нагревают 10 мин при 120°C, охлаждают и опрыскивают раствором б). Хроматограмму рассматривают в видимом и длинноволновом УФ-свете.

Применение. Обнаружение барбитуратов с двойной связью в боковой цепи в положении С-5. Некоторые другие медикаменты также реагируют с этим реактивом [107].

Т-47. Бромтимоловый синий

Реактив. Раствор 40 мг бромтимолового синего в 100 мл 0,01 н. гидроксида натрия.

Методика. Опрысканную пластинку обрабатывают парами аммиака.

Применение. Обнаружение липидов (сине-зеленые пятна) [108].

Предел обнаружения: 0,1—1 мкг.

Т-48. Бутилгипохлорит—иод

Реактив. а) Разделение проводят на слое силикагеля G с добавкой 0,5 % растворимого крахмала.

б) 1 %-ный раствор трет-бутилгипохлорита в циклогексане.
в) Свежеприготовленный 1 %-ный раствор иодида калия (ч. д. а.) в смеси ацетон—вода (3 : 1).

Методика. Разделение проводят на слое адсорбента, содержащего добавку крахмала. После высушивания равномерно опрыскивают пластинку раствором б), 15—20 мин обдувают потоком холодного воздуха, чтобы удалить избыток реактива, и опрыскивают раствором в). Окраску пятен можно усилить, если опрыскать пластинку водой, подкисленной соляной кислотой.

Применение. Обнаружение соединений, не реагирующих с вингидрином, например имидов, амидов и циклических пептидов [109].

Т-49. Нитрат кальция

Реактив. 5 %-ный раствор нитрата кальция в 95 %-ном этаноле.

Методика. Опрысканные пластинки облучают УФ-светом.

Применение. Обнаружение дифениламина (желто-зеленое пятно) [110].

Т-50. Нитрат аммония-церия(IV)—гидроксиламин

Реактив. а) 5 %-ный раствор нитрата аммония-церия(IV) [(NH₄)₂Ce(NO₃)₆] в ацетоне, свежеприготовленный и профильтрованный.

б) 5 %-ный раствор солянокислого гидроксиламина в 80 %-ном ацетоне.

Методика. Опрыскивают пластинку последовательно растворами а) и б) и высушивают горячим воздухом. В некоторых случаях можно повысить чувствительность обнаружения, если нагревать пластинку 5 мин при 110°C.

Применение. Обнаружение свободных фенольных групп и производных индола (алифатические спирты и амины, сахара, насыщенные циклические спирты, карбоновые кислоты, альдегиды и кетоны не реагируют) [111].

Предел обнаружения: 1—10 мкг.

Т-51. Сульфат аммония-церия(IV)

Реактив. 1 г сульфата аммония-церия(IV) нагревают с 99 г сиропа фосфорной кислоты до получения однородного раствора [112].

Применение. Обнаружение алкалоидов [113].

Т-52. Сульфат аммония-церия(IV)—молибдат

Реактив. а) 10 г порошка сульфата аммония-церия(IV) растирают с 17,5 мл концентрированной серной кислоты до получения однородной пасты. Продолжая растирание, медленно добавляют 20 мл воды, после этого доводят объем смеси водой до 100 мл и фильтруют.

б) Молибденовая синь (реактив Т-167).

Методика. Пластинку опрыскивают смесью растворов а) и б) (1 : 1).

Применение. Обнаружение желчных кислот [114].

- Предел обнаружения:** 1 мкг.
- T-53.** Сульфат церия(IV)
Реактив. Насыщенный раствор сульфата церия(IV) в 60 %-ной серной кислоте.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 15 мин при 120°C.
Применение. Обнаружение алкалоидов [115], гибберелинов (для обнаружения последних используется смесь насыщенного раствора сульфата церия с концентрированной серной кислотой, 1 : 1) [116].
- T-54.** Сульфат церия(IV)
Реактив. 0,3 %-ный раствор сульфата церия в концентрированной азотной кислоте.
Методика. Опрысканную пластинку рассматривают в УФ-свете (366 нм).
Применение. Обнаружение полифенилов [117].
- T-55.** Сульфат церия (IV)—трихлоруксусная кислота.
Реактив. 0,1 г сульфата церия(IV) кипятят в 4 мл воды, содержащих 1 г трихлоруксусной кислоты. Добавляют по каплям концентрированную серную кислоту ($d=1,84$) до получения прозрачного раствора [118].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают при 110°C.
Применение. Обнаружение токоферолов [119], тритерпеноидов, органических иодидов, кольхицинов, бруцина, пававерина, апоморфина, физостигмина.
- T-56.** Хлорамин Т
Реактив. 10 %-ный раствор хлорамина Т в воде.
Методика. Опрыскивают пластинку раствором хлорамина Т, затем 1 н. соляной кислоты, нагревают до 96—98°C, чтобы удалить хлор, и обрабатывают парами аммиака.
Применение. Обнаружение кофеина [33] (розово-красное окрашивание).
- T-57.** Хлорамин Т—трихлоруксусная кислота
Реактив. а) Свежеприготовленный 3 %-ный водный раствор хлорамина Т.
 б) 25 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты в этаноле (стабилен в течение нескольких дней).
Методика. Опрыскивают пластинку смесью 10 мл раствора а) и 40 мл раствора б), нагревают 5—10 мин при 110°C и рассматривают хроматограмму в длинноволновом УФ-свете.
Применение. Обнаружение карденолидов и буфадиинолидов.
Предел обнаружения: 0,01 мкг.
- T-58.** Хлоранил
Реактив. 0,2 %-ный раствор хлоранила (2,3,5,6-тетрахлор-1,4-бензохинона) в монохлорбензоле.
Методика. Опрыскивают пластинку свежеприготовленным реактивом. Реактив дает хорошие результаты на силикагеле, но непригоден для целлюлозы.
Применение. Обнаружение первичных и вторичных ароматических аминов [120].
Предел обнаружения: 0,01 мкг.
- T-59.** Хлор—бензидин
Реактив. 2 мл 10 %-ного раствора иодида калия смешивают со 100 мл 0,5 %-ного раствора бензидина в этаноле.
Методика. Пластинку обрабатывают в течение 5 мин газообразным хлором (хлор получают по реакции между перманганатом калия и соляной кислотой). Избыток хлора удаляют нагреванием до 105°C и опрыскивают пластинку раствором бензидина.
Применение. Обнаружение седативов, кофеина [121, 122].
- T-60.** Хлор—иодид калия—крахмал
Методика. Пластинку обрабатывают газообразным хлором в течение 30 мин, дают избытку хлора улетучиться и опрыскивают раствором крахмала, содержащим иодид калия [123].
Применение. Обнаружение эфиров карбобензоксиаминокислот [124].
- T-61.** Хлор—толуидин
Реактив. Растворяют 80 мг *o*-толуидина и 0,5 г иодида калия в 15 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до 250 мл [125].
Методика. Увлажняют пластинку, держа ее над кипящей водой, после этого обрабатывают 15—20 мин газообразным хлором и сушат на воздухе 2—3 мин. Затем опрыскивают уголок пластинки раствором *o*-толуидина. Если появляется синее окрашивание, следует выждать некоторое время и вновь опрыскать пластинку.
Применение. Обнаружение карбобензоксиаминокислот [126], фенилтиогидантоиновых аминокислот [127], тиамина, рибофлавина, пироксидина, цианкобаламина, никотиамида [128], биотина [129], алкилированных пуриновых и пиримидиновых оснований [130].
Предел обнаружения: 0,3 мкг биотина, 200 нг пуриновых и пиримидиновых оснований.
- T-62.** 9-Хлоракридин
Реактив. 21,3 мг 9-хлоракридина растворяют в 95 %-ном этаноле. Свежий раствор готовят ежедневно и хранят

в холодильнике. Перед использованием реактив перекристаллизовывают из легкого бензина (т. кип. 30—60°C).

Методика. Опрыскивают пластинку под хорошей вытяжкой, сушат 5 мин при 110°C и рассматривают полученную хроматограмму. В заключение рассматривают хроматограмму в длинноволновом УФ-свете для обнаружения арилгидроксиламинов (голубая флуоресценция) или ариламинов (тушение флуоресценции).

Применение. Обнаружение первичных ариламинов и арилгидроксиламинов (желтые или оранжевые пятна). Специфичное обнаружение арилгидроксиламинов в присутствии ариламинов [131].

Предел обнаружения: 0,5 нг (по флуоресценции или тушению флуоресценции).

T-63. Хлорсульфоновая кислота—уксусная кислота [132]

Реактив. Смесь хлорсульфоновой и уксусной кислот (1 : 2).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 1 мин при 130°C.

Применение. Обнаружение олефинов [133], сапогенинов [132], гликозидов дигиталиса (зеленые пятна, обладающие коричнево-фиолетовой флуоресценцией при облучении УФ-светом) [134].

T-64. Хромотроповая кислота—серная кислота

Реактив. Исходный раствор: 10 %-ный (масса/объем) раствор 1,8-диокси-нафталин-3,6-дисульфоната натрия. Опрыскивание проводят смесью 1 объема исходного раствора с 5 объемами смеси серная кислота—вода (5 : 3). Раствор для опрыскивания готовят ежедневно.

Методика. Высушенную пластинку опрыскивают реактивом, рассматривают хроматограмму, нагревают 30 мин при 105—110°C и вновь рассматривают хроматограмму, отмечая происшедшие изменения.

Применение. Обнаружение инсектицидных синергентов (производные 3,4-метилendioксифенила) [135].

Предел обнаружения: 0,1—5 мкг [136].

T-65. Коричный альдегид

Реактив. Раствор 5 мл коричневого альдегида в смеси этанол—концентрированная соляная кислота (95 : 5).

Применение. Оксискатолы [137], психотропные медикаменты.

T-66. «Хлорокс»—бензидин [138]

Реактив. а) 5 мл отбеливателя хлорокс растворяют в 50 мл бензола, добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты и сразу же опрыскивают этим раствором пластинки.

б) Растворяют 0,5 г бензидина и небольшой кристаллик

иодида калия в 50 мл 50 %-ного этанола и фильтруют полученный раствор. (В процессе приготовления и хранения раствор не должен подвергаться воздействию яркого света). Раствор стабилен в течение 2 ч.

Методика. Опрыскивают пластинку раствором а), высушивают под вытяжкой, чтобы удалить хлор, и опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение сфинголипидов (голубые пятна на белом фоне), кислых полисахаридов (в первом реактиве заменяют бензол на воду).

T-67. Ацетат кобальта—гидроксид лития (реактив Цвиккера)

Реактив. а) 0,5 %-ный раствор ацетата кобальта в метаноле. б) 0,5 %-ный раствор гидроксида лития в метаноле.
Методика. Опрыскивают пластинку сначала раствором а), затем раствором б).

Применение. Обнаружение барбитуратов [51].

T-68. Хлорид кобальта

Реактив. 1 %-ный раствор безводного хлорида кобальта в ацетоне.

Методика. Опрыскивают пластинку реактивом. Для обнаружения небольших количеств фосфорорганических эфиров необходимо нагреть пластинку до 40—50°C.

Применение. Обнаружение фосфорорганических соединений, в том числе триалкилфосфатов [139], ароматических аминов и имидазолов [140].

Предел обнаружения: 50 мкг/см² имидазолов.

T-69. Нитрат кобальта

Реактив. 2,5 г нитрата кобальта и 1,25 г тиоцианата аммония растворяют в 10 мл этанола.

Применение. Обнаружение фосфорорганических соединений [141], имидазолов [140].

T-70. Кобальтинитрит

Реактив. Смешивают 11,4 г ацетата кобальта $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 16,2 г ацтата свинца $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 20 г нитрита натрия и 2 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем смеси водой до 150 мл, центрифугируют и фильтруют.

Методика. Опрыскивают пластинку смесью реактива с метанолом (3 : 1). (Меркус [143] рекомендует предварительно опрыскать хроматограмму насыщенным раствором нитрата бария, чтобы осадить сульфат-ионы.)

Применение. Обнаружение калия.

Предел обнаружения: 2 мкг.

T-70a. Краситель Comassie Brilliant Blue

Реактив. а) 5 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

- б) 1 %-ный исходный раствор красителя Comassie Brilliant Blue (фирменный индекс 42660, фирма CoLab). 10 мл исходного раствора смешивают с 7 мл ледяной уксусной кислоты и 25 мл метанола и доводят объем смеси водой до 100 мл. в) 7 %-ная уксусная кислота.
Методика. Пластинки с гелем выдерживают сначала 15 мин при 4°C в растворе а), после этого в свежеприготовленном и профильтрованном растворе б) при той же температуре в течение 60—72 ч. После этого в течение двух часов многократно промывают в свежих порциях раствора в) и споласкивают в воде.
Применение. Реактив общего назначения для обнаружения белков на полиакриламидных гелях [186а].
- T-71. Ацетат меди(II)—дитиооксамид [144]
Реактив. а) 20 мл насыщенного раствора ацетата меди(II) разбавляют водой до 1000 мл. б) 0,1 %-ный спиртовой раствор дитиооксамида.
Методика. 1) Стабилизация хроматограммы для промывки [145]. Проявленную и высушенную пластинку помещают в вакуумный эксикатор, содержащий 3—5 мл диметилдихлорсилана, и выдерживают 15 мин при давлении 300 мм рт. ст. После этого пластинку извлекают и выдерживают 30 мин на воздухе.
 2) Окунают пластинку в воду.
 3) Погружают на 10 мин в раствор а).
 4) Промывают 10 мин в проточной воде, затем ополаскивают дистиллированной водой.
 5) Погружают на 10 мин в раствор б).
 6) Снова промывают в дистиллированной воде.
Применение. Обнаружение жирных кислот (зеленые пятна на белом фоне).
- T-72. Ацетат меди(II)—нитрат серебра
Реактив. Растворяют 1,7 г нитрата серебра и 1,8 г ацетата меди в 20 мл концентрированного раствора гидроксида аммония. Доводят объем смеси абсолютным этанолом до 100 мл [146].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 20—30 мин при 100—120°C.
Применение. Обнаружение тритиофторбензальдегидов.
- T-73. Хлорид меди(II)
Реактив. а) 0,5 %-ный раствор хлорида меди(II). б) Насыщенный спиртовой раствор ацетата меди(II).
Применение. Окисмы [147]. При обнаружении α -бензальдоксима следует опрыскать пластинку раствором б), далее нагревать 10 мин при 100°C.
- T-74. Хлорид меди(II).
Реактив. 2 г хлорида меди(II) растворяют в 11 мл этанола и добавляют 2,5 мл концентрированной соляной кислоты.
Применение. Обнаружение систокса и мета-систокса [148].
- T-75. Сульфат меди(II)
Реактив. Смесь 10 %-ного раствора сульфата меди(II) и 2 %-ного раствора аммиака (5:1).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 110°C. Соединения, содержащие амидогруппы, дают голубые или коричневые пятна.
Применение. Обнаружение диуретиков [149].
- T-76. 3,5-Диаминобензойная кислота—фосфорная кислота
Реактив. 1 г дигидрохлорида 3,5-диаминобензойной кислоты растворяют в смеси 25 мл 80 %-ной фосфорной кислоты и 60 мл воды.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают до появления пятен и рассматривают хроматограмму в УФ-свете.
Применение. Обнаружение 2-дезоксисахаров [156] (зелено-желтая флуоресценция).
- T-77. *o*-Дианизидин.
Реактив. Насыщенный раствор *o*-дианизидина в ледяной уксусной кислоте.
Применение. Обнаружение альдегидов [3].
- T-78. Диазотирующий реактив
Реактив. а) 3 %-ный (объем/объем) раствор пентилнитрита в диэтиловом эфире с добавкой 3 % 98 %-ной муравьиной кислоты.
 Реактив стабилен в течение 2 месяцев.
 б) 1 %-ный раствор 2-нафтола в 5 %-ном растворе гидроксида натрия. Раствор готовят ежемесячно.
Методика. Опрыскивают пластинку раствором а) (1 мл на 10 см²), сушат 10 мин в токе воздуха при комнатной температуре, после чего осторожно опрыскивают раствором б).
Применение. Обнаружение первичных ариламинов. Моноамины обычно дают красную окраску, а диамины — пурпурную [151].
- T-79. 2,6-Дибромбензохинон—4-хлоримид
Реактив. 1 %-ный раствор 2,6-дибром-*N*-хлор-*n*-хинонимина.
Применение. Обнаружение моно- и диэфиров фосфорных и тиофосфорных кислот (тиольные и сульфгидрильные группы дают желтые пятна, тионовые группы — красные,

- тиомочевины — коричневые [152]), ароматических аминов и карбазолов [153].
Предел обнаружения: 0,5 мкг.
- T-80.** 2,3-Дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
Реактив. а) 0,1 %-ный раствор препарата в бензоле, готовится непосредственно перед использованием. б) 2 %-ный раствор препарата в бензоле [154].
Методика. При обнаружении серосодержащих пестицидов пластинку сушат 30 мин при 85°C, охлаждают и обрабатывают парами брома. Затем обдувают холодным воздухом в течение минуты, чтобы удалить избыток брома, опрыскивают раствором а), выдерживают 2 мин и слегка опрыскивают 90 %-ным этанолом, после чего 30 мин облучают УФ-светом. При обнаружении сульфоксидов, сульфонов и сульфидов опрыскивают пластинку раствором б), рассматривают полученную хроматограмму, затем обрабатывают парами аммиака и рассматривают снова. Сульфоксиды дают пятна, окрашенные в цвета от оранжевого до малинового, сульфоны — от лилового до фиолетового, сульфиды — от розового до синего, причем после обработки аммиаком цвет меняется на розово-оранжевый. При обнаружении карбазолов применяют опрыскивание раствором а).
Применение. Обнаружение серосодержащих соединений и карбазолов.
Предел обнаружения: пестициды 0,05 мкг [155], карбазолы 0,1 мкг [156].
- T-81.** 2',7'-Дихлорфлуоресцеин
Реактив. 0,2 %-ный раствор 2',7'-дихлорфлуоресцеина в этаноле [157].
Методика. Опрысканную пластинку рассматривают в УФ-свете.
Применение. Обнаружение липидов (яркая желто-зеленая флуоресценция).
- T-82.** 2,6-Дихлорфенол—индофенол
Реактив. а) Насыщенный на холоду раствор 2,6-дихлорфенола—индофенола [158]. б) 0,1 %-ный раствор 2,6-дихлорфенола—индофенола в 95 %-ном этаноле [159].
Методика. Опрыскивают пластинку раствором а) или б). Небольшое нагревание может способствовать образованию окрашенных пятен.
Применение. Обнаружение органических кислот (розовые пятна на небесно-голубом фоне).
- T-83.** Хлоримид дихлорхинона
Реактив. а) 0,4 %-ный раствор хлоримида дихлорхинона.
- б) 10 %-ный раствор карбоната натрия в 30 %-ном метаноле.
Методика. Пластинку опрыскивают сначала раствором а), затем раствором б).
Применение. Обнаружение соединений, входящих в состав алоэ [160].
- T-84.** Хлоримид дихлорхинона
Реактив. 0,1 %-ный раствор хлоримида дихлорхинона в этаноле.
Методика. Опрысканную пластинку обрабатывают парами аммиака.
Применение. Обнаружение витамина В₆ (голубое пятно) [161], фенольных терпенов (пятна различных цветов) [162].
Предел обнаружения: 0,1 мкг биотина [129].
- T-85.** Хлоримид дихлорхинона
Реактив. 1 %-ный раствор хлоримида 2,6-дихлорхинона в этаноле.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором реактива, выжидают 15 мин и опрыскивают 2 %-ным раствором буры (в некоторых случаях при этом наблюдается изменение окраски пятен).
Применение. Обнаружение антиоксидантов [163, 164].
- T-86.** Дикобальтоктакарбонил
Реактив. а) 0,5 %-ный раствор дикобальтоктакарбонила в петролейном эфире (т. кип. 120—135°C)
 б) 0,5 %-ный раствор α -нитрозо- β -нафтола в смеси уксусная кислота—вода (1:1).
Методика. Высушенную пластинку опрыскивают реактивом а), выжидают 10 мин, опрыскивают 1 н. раствором соляной кислоты, снова высушивают и опрыскивают «ниатаном». Затвердевшую пластинку увлажняют и тщательно промывают в течение приблизительно 2 ч. После этого отжимают ее между листами фильтровальной бумаги, чтобы удалить избыток жидкости, и в течение минуты обрабатывают парами брома. Далее пластинку погружают в реактив б), извлекают и удаляют избыток реактива 0,5 %-ным раствором аммиака.
Применение. Обнаружение полиацетиленов (красно-коричневые пятна на желтом фоне) [165].
- T-87.** 9-Дицианометил-2,4,7-тринитрофлуорен.
Реактив. 2 г препарата растворяют в 100 мл ацетона. Раствор готовят непосредственно перед использованием.
Применение. Обнаружение простых ароматических эфиров [166].

- Т-88. *n*-Диэтиламинобензальдегид
Реактив. 0,25 %-ный раствор *n*-диэтиламинобензальдегида в 0,25 н. этанольном растворе соляной кислоты (готовят из концентрированной соляной кислоты и абсолютного этанола).
Методика. Восстановитель (цинк) вводят непосредственно в слой (3 г цинковой пыли на 30 г силикагеля).
Применение. Обнаружение нитросоединений [167], нитрозодифениламинов [168].
Предел обнаружения: 1—4 мкг.
- Т-89. *n*-Диметиламинобензальдегид—хлорид железа(III) (реактив Ван Урка)
Реактив. 0,125 г *n*-диметиламинобензальдегида и 0,1 мл 5 %-ного раствора хлорида железа(III) растворяют в 100 мл 65 %-ной серной кислоты.
Применение. Обнаружение фенотиазиновых производных [169], оксискатолов [136], N,N-диэтил-D-лизергиламида (ЛСД) [170].
Предел обнаружения: 0,05 мкг ЛСД.
- Т-90. *n*-Диметиламинобензальдегид (реактив Эрлиха)
Реактив. 1 г препарата растворяют в смеси 25 мл концентрированной соляной кислоты и 75 мл метанола.
Применение. Обнаружение оксискатолов [136], алкалоидов [171], сульфонамидов (лимонно-желтые пятна) [172], прочных оснований [173].
- Т-91. *n*-Диметиламинобензальдегид (модифицированный реактив)
Реактив. 1 г *n*-диметиламинобензальдегида растворяют в смеси 30 мл этанола, 3 мл концентрированной соляной кислоты и 180 мл бутанола-1 [174].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 30 мин при 120°C.
Применение. Обнаружение производных фенилмочевины, карбаматов и гербицидов на основе мочевины [175].
Предел обнаружения: 0,2—0,4 мкг.
- Т-92. *n*-Диметиламинобензальдегид (модифицированный реактив)
Реактив. 1 %-ный раствор *n*-диметиламинобензальдегида в 5 %-ной соляной кислоте [176].
Применение. Обнаружение сульфонамидов.
- Т-93. Диметилглиоксим
Реактив. а) 10 %-ный раствор диметилглиоксима в аммиачном растворе этанола.
 б) 1 %-ный раствор диметилглиоксима в 95 %-ном этаноле.

- Методика.** Тонкослойные хроматограммы опрыскивают реактивом а). Ионофореграммы, полученные на агаре, обрабатывают 3 мин парами аммиака и выдерживают 1—2 мин в реактиве б).
- Применение.** Обнаружение никеля (красное пятно) [177].
- Т-94. Дигидрохлорид диметил-*n*-фенилендиамин
Реактив. а) 1,5 г дигидрохлорида N,N-диметил-*n*-фенилендиамин растворяют в смеси 128 мл метанола, 25 мл воды и 1 мл уксусной кислоты [178].
 б) 0,5 г диамина растворяют в свежеприготовленном растворе 1 г натрия в 100 мл этанола [179].
Применение. Обнаружение органических пероксидов [реактив а) дает пурпурно-красные пятна], хлорированных пестицидов [опрысканную реактивом б) пластинку опрыскивают водой и в течение минуты облучают УФ-светом. Получаются пятна цветом от грязно-фиолетового до зеленого], карбромала [180].
Предел обнаружения: <0,5 мкг пестицидов, 5 мкг карбромала, 0,1 мкг пероксидов.
- Т-95. *m*-Динитробензол—гидроксид калия (реактив Циммермана)
Реактив. Смесь 1 %-ного раствора *m*-динитробензола в этаноле и 5 н. раствора гидроксида калия (2:1).
Методика. Опрысканную пластинку высушивают в потоке горячего воздуха.
Применение. Обнаружение 17- и 3-кетостероидов [181], метиленовых групп, активированных кетогруппой в *орто*-положении [182].
- Т-96. 2,4-Динитрофенилгидразин
Реактив. 0,4 г 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 100 мл 2 н. соляной кислоты.
Применение. Обнаружение карбонильных соединений (пятна цветом от желтого до красного) [49] и производных тестостерона.
- Т-97. Дифениламин
Реактив. 2,3 г дифениламина растворяют в 100 мл воды, насыщенной *n*-бутанолом.
Методика. Опрысканную пластинку сушат сначала на воздухе, а затем 20 мин при 130°C.
Применение. Обнаружение альдоз и кетоз (голубые пятна) [183].
- Т-98. Дифениламин
Реактив. 20 мл 10 %-ного раствора дифениламина в спирте растворяют в смеси 100 мл концентрированной соляной кислоты и 80 мл ледяной уксусной кислоты.

- Методика.** Пластинку слегка опрыскивают реактивом, покрывают стеклом и нагревают при 110°C до появления пятен [30—40 мин].
- Применение.** Обнаружение гликолипидов (голубые пятна) [108, 184].
- T-99. Дифениламин
Реактив. 1 %-ный раствор дифениламина в 95 %-ном этаноле.
Методика. Опрысканную пластинку облучают коротковолновым УФ-светом.
Применение. Обнаружение эфиров азотной кислоты (желто-зеленые пятна на бесцветном фоне) [110]. Взрывчатые вещества (для опрыскивания используют 5 %-ный раствор дифениламина) [185] дают разноцветные пятна. Обнаружение хлорированных пестицидов (реактив разбавляют этанолом в отношении 1 : 10) [93].
Предел обнаружения: 0,5 мкг пестицидов.
- T-100. Дифениламин—хлорид палладия
Реактив. а) 1,5 %-ный раствор дифениламина в этаноле. б) 0,1 %-ный раствор хлорида палладия в 0,2 %-ном растворе хлорида натрия.
Методика. Пластинку слегка опрыскивают смесью растворов а) и б) (5 : 1). Влажную пластинку облучают УФ-светом (240 мкм).
Применение. Обнаружение нитрозаминов (голубые или фиолетовые пятна на бесцветном фоне) [186]. Определению мешают хиноидные и нитросоединения.
Предел обнаружения: 0,5 мкг (для летучих соединений 1—2 мкг).
- T-101. Дифениламин—хлорид цинка
Реактив. В 100 мл ацетона растворяют 0,5 г дифениламина и 0,5 г хлорида цинка.
Методика. Высушенную пластинку опрыскивают реактивом и нагревают 5 мин при 200°C.
Применение. Обнаружение хлорированных пестицидов (разноцветные пятна) [187, 188].
Предел обнаружения: 1—5 мкг.
- T-102. β-Аминоэтиловый эфир—дифенилборная кислота
Реактив. 1 %-ный раствор β-аминоэтилового эфира и дифенилборной кислоты в метаноле.
Методика. Опрысканную хроматограмму рассматривают в УФ-свете (366 мкм); детектируемые компоненты дают флуоресцирующие пятна.
Применение. Обнаружение флавонолов, кумаринов и их производных [189].
- T-103. *симм*-Дифенилкарбазид
Реактив. 1 %-ный раствор *симм*-дифенилкарбазида в 95 %-ном этаноле.
Методика. При разделении ионов металлов методом ионофореза пластинку промывают водой, обрабатывают парами аммиака и погружают на 10 мин в реактив. При обнаружении разделенных компонентов на тонкослойной хроматограмме пластинку опрыскивают сначала реактивом, а затем 25 %-ным раствором аммиака.
Применение. Обнаружение ионов тяжелых металлов [190].
Предел обнаружения: <0,5 мкг.
- T-104. *симм*-Дифенилкарбазон
Реактив. 0,1 %-ный раствор *симм*-дифенилкарбазона в 95 %-ном этаноле.
Применение. Ацетоксиртутные и метоксиртутные производные ненасыщенных сложных эфиров и барбитуратов (пурпурные пятна на бледно-розовом фоне) [191, 192]. Соли диалкилолова (триалкильные производные не реагируют) дают фиолетово-красные пятна (для опрыскивания применяют 0,01 %-ный раствор реактива в хлороформе) [193].
- T-105. Дифенилпикрилгидразил
Реактив. 15 мг дифенилпикрилгидразида растворяют в 25 мл хлороформа.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5—10 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение терпеновых углеводов, спиртов, карбонильных соединений, оксидов, сложных и простых эфиров (желтые пятна на пурпурном фоне) [194].
- T-106. Хлорид 2,5-дифенил-3(4-стирилфенил)-тетразолия
Реактив. а) 1 %-ный метанольный раствор хлорида 2,5-дифенил-3(4-стирилфенил)-тетразолия. б) 3 %-ный водный раствор гидроксида натрия.
Методика. Смешивают 1 объем раствора а) и 10 объемов б) и этой смесью сразу же опрыскивают пластинку, если разделение проводится на оксиде алюминия. При разделении на силикагеле вначале опрыскивают пластинку 2 н. раствором гидроксида натрия, чтобы создать щелочную среду.
Применение. Обнаружение стероидов (ярко-пурпурные пятна на желтом фоне) [195].
Предел обнаружения: <0,1 мкг.

- T-107.** Дипикриламид
Реактив. 0,2 г дипикриламида растворяют в смеси 50 мл ацетона и 50 мл воды.
Методика. Пластинку обильно опрыскивают реактивом до появления пятен.
Применение. Обнаружение гартрата холина (темно-красное пятно на желтом фоне; окраска становится более интенсивной после 5-минутного нагревания при 80°C [129]).
Предел обнаружения: 3 мкг.
- T-108.** Дипиридил—хлорид железа(III) (реактив Эммери—Энгеля)
Реактив. Смесь равных объемов 0,2 %-ного (масса/объем) раствора хлорида железа(III) в 95 %-ном этаноле и 0,5 %-ного (масса/объем) раствора α, α' -дипиридила в 95 %-ном этаноле.
Применение. Обнаружение гидрохинонов [196], токоферолов [197].
- T-109.** Дитиооксамид (рубеновый водород)
Реактив. 0,1 %-ный раствор дитиооксамида в смеси этанол—*n*-бутанол (1:1).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 20 мин при 100°C.
Применение. Обнаружение ионов металлов (меди, кобальта, никеля) [198].
Предел обнаружения: 0,03—0,05 мкг.
- T-110.** Дитизон
Реактив. 0,01 %-ный раствор дитизона в четыреххлористом углероде или хлороформе.
Методика. Опрыскивают пластинку реактивом, рассматривают появившиеся пятна, затем опрыскивают 25 %-ным раствором аммиака и наблюдают изменение окраски пятен.
Применение. Обнаружение ионов тяжелых металлов [199], солей олова и органических соединений [193], ртути содержащих органических фунгицидов (для обнаружения используется 0,5 %-ный раствор реактива) [200].
Предел обнаружения: 0,5—20 мкг фунгицидов.
- T-111.** Реактив Драгендорфа по Тису и Ройтеру [201] (модифицированный Вагуйфальви [202])
Реактив. 2,6 г карбоната висмута и 7,0 г иодида натрия растворяют в 25 мл кипящей ледяной уксусной кислоты, оставляют на 12 ч и после этого фильтруют, чтобы отделить ацетат натрия. Исходный раствор (хранить в темной склянке!) готовят, добавляя к профильтрованному раствору 8 мл этилацетата. Раствор для опрыскивания:

- смесь исходного раствора с уксусной кислотой и этилацетатом (1:2,5:6).
Применение. Обнаружение алкалоидов (оранжевые пятна; интенсивность окраски увеличивается при опрыскивании 0,05 н. серной кислотой [202]); специфичный реактив на аденин: лимонно-желтое пятно при опрыскивании кислотой становится кроваво-красным [203].
- T-112.** Реактив Драгендорфа (модификация Мунье [204])
Реактив. а) 17 г основного нитрата висмута и 200 г винной кислоты растворяют в 800 мл воды.
 б) 160 г иодида калия растворяют в 400 мл воды. Для опрыскивания используют раствор содержащий 25 мл смеси реактивов а) и б) и 50 г винной кислоты на 250 мл воды. Этот раствор стабилен в течение недели; исходный раствор можно хранить более месяца.
Применение. Обнаружение алкалоидов [205], циклогексилламинов [206], полиэтиленгликолей и их производных [207], производных оксида этилена [208], лактамов [209], липидов [210], α, β -ненасыщенных стероидов [182], системных фунгицидов [211].
Предел обнаружения: 0,25—1,0 мкг.
- T-113.** Реакция ингибирования эстеразы
Реактив. а) Смесь 0,01 М буферного раствора (трис(оксиметил)аминометан—малеат—трисмалеат) с 0,01 М раствором никотинамида (рН 7,2).
 б) 0,05 М раствор трис(оксиметил)аминометана (буферный раствор с рН 8,3). в) Окислительный раствор, содержащий по 0,05 моль/л ферроцианида и феррицианида калия.
 г) Раствор фермента для опрыскивания. Гомогенизируют в течение 2 мин на гомогенизаторе VirTis (реостат устанавливают на отметку 50) 50 г свежей говяжьей печени со 180 мл раствора а) и после этого центрифугируют 5 мин при 4°C при 2000g. Отбирают 100 мл верхнего слоя жидкости, доводят объем до 500 мл раствором а) и добавляют хлорид магния в таком количестве, чтобы его концентрация составляла 0,1 моль/л. Полученную смесь выдерживают 24 ч при 1—9°C, далее центрифугируют 15 мин при 300g. Верхний слой жидкости, содержащий фермент, можно заморозить и хранить несколько месяцев.
 д) 13 мл раствора б) смешивают сначала с 2 мл раствора в), а затем с раствором 15 мг 5-броминдоксилацетата в 5 мл этанола.
Методика. Пластинку высушивают на воздухе и далее обрабатывают парами брома (пожелтение пластинки указывает на чрезмерную длительность обработки). Остав-

- ляют стоять на воздухе до исчезновения запаха брома, после чего постепенно и равномерно опрыскивают реактивом г) до хорошего увлажнения геля. Сушат пластинку 20 мин при комнатной температуре и опрыскивают реактивом д). Через 1—30 мин на голубом фоне появляются белые пятна [212].
- Применение.** Обнаружение фосфорорганических пестицидов.
- Предел обнаружения:** 0,1—1000 нг. (Нельзя перегружать хроматограмму растительными экстрактами, поскольку очень большие пробы экстрактов, не содержащие пестицидов, также могут давать зоны ингибирования [213].)
- T-114. Этилендиамин
- Реактив.** Смешивают равные объемы этилендиамина и воды или разбавленного раствора гидроксида натрия.
- Методика.** Опрысканные пластинки нагревают 20 мин при 50—60°C. Хроматограмму рассматривают в УФ-свете.
- Применение.** Обнаружение катехаминов [214].
- Предел обнаружения:** 0,003—0,005 мкг.
- T-115. Соль «прочная голубая В» (тетраазотированный ди-о-анизидин)
- Реактив.** 0,5 %-ный раствор препарата.
- Методика.** Опрыскивают пластинку сначала реактивом, затем 0,1 н. раствором гидроксида натрия.
- Применение.** Обнаружение фенолов [215], каннабидиолов [91].
- T-116. Соль «прочная голубая ВВ» (диазотированный 1-амино-4-бензоиламидо-2,5-диэтоксibenзол)
- Реактив.** 0,5 %-ный раствор препарата.
- Методика.** Пластинку опрыскивают сначала реактивом, затем 0,1 н. раствором гидроксида натрия.
- Применение.** Обнаружение фенолов [215], антрахинонов (пластинку опрыскивают вначале спиртовым раствором гидроксида калия, затем реактивом) [216].
- T-117. Соль «прочная красная В» (диазотированный 5-нитро-2-аминоанизол)
- Реактив.** 0,5 %-ный раствор препарата.
- Методика.** Пластинку опрыскивают сначала реактивом, затем 0,1 н. раствором гидроксида натрия.
- Применение.** Обнаружение фенолов [215], оксибензофенонов [217].
- T-118. Хлорид железа(III)
- Реактив.** а) Смесь 5 %-ного раствора хлорида железа(III) и 2 н. раствора уксусной кислоты (1:1).
б) 2 %-ный водный раствор хлорида железа(III),
- в) Насыщенный раствор безводного хлорида железа(III) в метаноле.
- г) Растворяют 16,7 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 10 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем раствора метанолом до 1 л.
- Применение.** С помощью реактива а) проводят обнаружение пиразолонов [44]. Реактив б) позволяет отделить фенотиазины (цвет пятен от красного до фиолетового) от сульфоксидов фенотиазинов (не реагируют) [218]; пригоден также для обнаружения ионов ферроцианида, феррицианида и тиоцианата [219]. Реактивом в) обнаруживают терпеновые фенолы [162], а реактивом г) гидроксамовые кислоты [220].
- T-119. Хлорид железа(III)—хлорная кислота—азотная кислота
- Реактив.** Смесь 5 %-ного раствора хлорида железа(III), 20 %-ной хлорной и 50 %-ной азотной кислот (1:9:10) [221].
- Применение.** Обнаружение фенотиазинов.
- T-120. Хлорид железа(III)—феррицианид калия
- Реактив.** Свежеприготовленная смесь 0,1 М раствора хлорида железа(III) и 0,1 М раствора феррицианида калия (1:1).
- Применение.** Обнаружение ароматических аминов (голубые пятна) [222], триптамина [223], фенолов и фенольных стероидов [18].
- T-121. Хлорид железа(III)—феррицианид калия
- Реактив.** а) В 100 мл 2 н. соляной кислоты растворяют 1,3 г хлорида железа(III).
б) В 100 мл воды растворяют 0,7 г феррицианида калия.
- Методика.** Смешивают равные объемы свежеприготовленных растворов а) и б) непосредственно перед употреблением. При обработке пластинок избегают нагревания и воздействия яркого света, так как они усиливают окрашивание фона.
- Применение.** Обнаружение растворимых в жирах витаминов и антиоксидантов. При обнаружении ацетата α -токоферола смешивают реактив с концентрированной соляной кислотой (2:1).
- T-122. Хлорид железа(III)—феррицианид калия—арсенит
- Реактив.** а) 2,7 %-ный раствор хлорида железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в 2 н. соляной кислоте.
б) 3,5 %-ный раствор феррицианида калия.
в) В 25 мл 2 н. раствора гидроксида натрия растворяют 3,8 г триоксида мышьяка, охлаждают до 5°C и добавляют 50 мл 2 н. серной кислоты (также охлажденной до 5°C). Объем смеси доводят водой до 100 мл.

Методика. Смешивают растворы а), б) и в) в соотношении 5:5:1 непосредственно перед использованием, опрыскивают смесью пластинку и после появления окрашенных пятен осторожно промывают ее водой. (Методика пригодна при разделении на адсорбентах, содержащих крахмал в качестве связующего.)

Применение. Обнаружение подаминокислот [224].

Т-123. Хлорид железа (III)—молибдат натрия

Реактив. а) Насыщенный раствор хлорида железа (III). б) 0,1 М раствор молибдата натрия.

Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и немедленно вслед за этим раствором б), после чего нагревают 3—5 мин при 140°C.

Применение. Реактив позволяет различать насыщенные и ненасыщенные метиловые эфиры. Первые дают оранжевые пятна, а вторые сине-пурпурные пятна на коричневом фоне [225].

Т-124. Хлорид железа (III)—сульфосалициловая кислота

Реактив. а) В 1 мл 1 н. соляной кислоты растворяют 0,1 г хлорида железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и доводят объем раствора до 100 мл 80 %-ным этанолом.

б) 1 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты в 80 %-ном этаноле [73].

Методика. Пластинку опрыскивают последовательно растворами а) и б).

Применение. Обнаружение фосфорорганических пестицидов.

Т-125. Хлорид железа (III)—сульфосалициловая кислота

Реактив. В 25 мл воды растворяют 0,1 г хлорида железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и 7,0 г сульфосалициловой кислоты и доводят объем раствора до 100 мл 95 %-ным этанолом.

Применение. Обнаружение фосфатных групп в липидах (белые флуоресцирующие пятна на пурпурном фоне) [226].

Т-126. Сульфат железа (III)—феррицианид калия

Реактив. а) 0,5 %-ный раствор сульфата железа (III) в 1 н. серной кислоте.

б) 0,2 %-ный раствор феррицианида калия [162].

Методика. Непосредственно перед использованием смешивают разные объемы растворов а) и б). Опрыскивают пластинку, рассматривают появившиеся пятна, затем нагревают 10 мин при 110°C и отмечают изменение окраски.

Применение. Обнаружение фенольных соединений.

Т-127. Железоаммонийные квасцы—тиоцианат калия

Реактив. Смесью растворов указанных реактивов.

Применение. Обнаружение стабильных пероксидов, не реагирующих с иодидом калия [227].

Т-128. Флуорескамин

Реактив. а) В 100 мл ацетона (ч. д. а) растворяют 10 мг флуорескамина (выпускается фирмой Hoffman-LaRoche под названием Flugam). Чтобы увеличить срок годности реактив, следует использовать чистую мерную колбу и безводные исходные соединения. Раствор хранят в холодильнике.

б) 10 %-ный раствор триэтиламина в метилхлориде марки «пестицидный»; приготовленный раствор хранят в холодильнике.

Методика. Пластинку сушат 30—60 мин. Опрыскивают реактивом а), сушат в потоке воздуха 2 мин и опрыскивают реактивом б), который стабилизирует флуоресценцию и позволяет провести количественные измерения. Пластинку оставляют на 40 мин, после чего приступают к количественным измерениям.

Применение. Обнаружение первичных аминокислот, пептидов, белков [228]. Для обнаружения альдегидов наносят на пластинку пробу, сверху наносят 5 мкг анилина и элюируют соответствующим растворителем. Детектируют разделенные компоненты, как описано выше [229]. Первичные амины дают пятна с аквамаринной или желтой флуоресценцией, для пятен вторичных аминов характерна яркая пурпурная флуоресценция с постепенным затуханием, переходящая в желтую, если обработать пластинку 5-диметиламинонафталин-1-сульфонилхлоридом [230].

Предел обнаружения: от 4 до 80 нг аминокислот, пептидов и белков, от 20 до 200 нг альдегидов.

Т-129. Флуорескамин—ледяная уксусная кислота

Реактив. Раствор 1 мг/мл флуорескамина (Flugam, фирмы Hoffman-LaRoche) в ледяной уксусной кислоте. Стабилен при комнатной температуре в течение нескольких недель.

Методика. Сухую пластинку опрыскивают реактивом и дают снова высохнуть.

Применение. Реактив для специфичного обнаружения ароматических аминов. Все они, за исключением дихлорбензида, образуют стабильные желтые продукты: соединения, образующиеся при взаимодействии дихлорбензида с данным реактивом, обесцвечиваются по истечении 5 мин [231].

Предел обнаружения: наномоли.

Т-130. Флуоресцеин—бром

- Реактив.** 0,05 %-ный раствор флуоресцеина натрия.
Методика. Опрысканную пластинку обрабатывают парами брома. (Следует избегать перенасыщения пластинки бромом.)
Применение. Ненасыщенные соединения (производные этилена и другие), реагирующие с бромом. Желтые пятна на розовом фоне [3].
- T-131. Реактив Фолина—Сиокалто
Реактив. а) В 70 мл воды растворяют 10 г вольфрамата натрия и 2,5 г молибдата натрия, добавляют 5 мл фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной соляной кислоты, кипятят с обратным холодильником 10 ч, добавляют 15 г сульфата лития, 5 мл воды и одну каплю брома. Снова кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин, охлаждают и доводят объем раствора водой до 100 мл. Полученный раствор не должен иметь зеленой окраски.
 б) 20 %-ный раствор карбоната натрия [232].
Методика. Опрыскивают пластинку раствором б), слегка подсушивают и опрыскивают смесью реактива а) с водой (1:3).
Применение. Обнаружение метилгидразинов [233], фенолов, фенольных карбоновых кислот, эстрогенов.
Предел обнаружения: 0,12 мкг/см² гидразинов [234].
- T-132. Формальдегид—соляная кислота (реактив Прохазки) [170].
Реактив. Свежеприготовленная смесь 35 %-ного раствора формальдегида, 25 %-ной соляной кислоты и 95 %-ного этанола (1:1:2).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5 мин при 100°C.
Применение. Обнаружение производных индолов (при дневном свете пятна окрашены в различные цвета, в УФ-свете флуоресцируют) [171]. Окраску можно усилить, опрыскивая пластинку царской водкой (смесь концентрированной соляной и азотной кислот в соотношении 3:1 по объему).
Предел обнаружения: 0,01 мкг.
- T-133. Формальдегид—серная кислота
Реактив. Смесь 40 %-ного раствора формальдегида, воды и серной кислоты (1:45:55).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 120°C. Чувствительность обнаружения можно повысить, опрыскав пластинку реактивом Драгендорфа по Тису и Ройтеру, модифицированным Вагуйфальви [237] (см. выше).
- Применение.** Обнаружение феноптиазинов.
- T-134. Формальдегид—серная кислота
Реактив. В 50 мл концентрированной серной кислоты растворяют 1,0 мл 37 %-ного формальдегида [238].
Применение. Обнаружение углеводов и гетероциклических соединений (более реакционноспособных, чем тетрацианэтилен).
- T-135. Пары муравьиной кислоты
Методика. Пластинку обрабатывают в течение минуты парами муравьиной кислоты.
Применение. Обнаружение хинина и хинидина [239]. Интенсивная голубая флуоресценция в УФ-свете.
- T-136. Фурфураль—серная кислота
Реактив. Смесь свежеперегнанного фурфурала с концентрированной серной кислотой (1:50).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 30 мин при 105—110°C.
Применение. Обнаружение синергентов 3,4-метилendioксифенила [135].
- T-137. Фуксин—сернистая кислота (реактив Шиффа)
Реактив. а) Через 0,1 %-ный раствор фуксина пропускают диоксид серы до обесцвечивания раствора.
 б) Растворяют в воде 1 мл раствора а), 1 мл 0,05 М раствора хлорида ртути(II) и 10 мл 0,05 М серной кислоты и доводят объем раствора водой до 100 мл [226].
Применение. Обнаружение альдегидных групп (фиолетовые пятна на бледно-фиолетовом фоне).
- T-138. Gentian violet—бром
Реактив. 0,1 %-ный раствор красителя Gentian violet в метаноле.
Методика. Опрысканную пластинку обрабатывают парами брома.
Применение. Обнаружение липидов (голубые пятна на желтом фоне) [240].
- T-139. Глюкоза—фосфорная кислота
Реактив. Смесь 2 г глюкозы, 10 мл 85 %-ной фосфорной кислоты, 40 мл воды, 30 мл этанола и 30 мл *n*-бутанола.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 115°C.
Применение. Обнаружение ароматических аминов, эритромицинов [241].
- T-140. Сернокислый гидразин
Реактив. а) Смесь насыщенного раствора сернокислого гидразина и 4 н. соляной кислоты в соотношении 9:1 [242].

- б) 1 %-ный раствор сернокислого гидразина в 1 н. соляной кислоте [243].
Методика. Опрысканную пластинку рассматривают в видимом и УФ-свете, нагревают до 100°C и снова рассматривают в УФ-свете.
Применение. Обнаружение альдегидов.
- T-141. Пары соляной кислоты
Методика. Пластинку обрабатывают парами соляной кислоты в герметичной камере.
Применение. Обнаружение хальконов (красные пятна) [244], 4-диметиламиноазобензола и метаболитов [245].
- T-142. Сероводород
Методика. Пластинку обрабатывают хорошо промытым сероводородом.
Применение. Обнаружение неорганических ионов [246].
- T-143. *n*-Оксибензальдегид—серная кислота (реактив Комаровского)
Реактив. Свежеприготовленная смесь 2 %-ного метанольного раствора *n*-оксибензальдегида и 50 %-ной (объем/объем) серной кислоты (10:1).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 60°C.
Применение. Обнаружение стероидов.
- T-144. Гидроксиламин—нитрат железа(III)
Реактив. а) Раствор 1 г гидроксиламина в 9 мл воды.
 б) Раствор 2 г гидроксида натрия в 8 мл воды.
 в) Раствор 4 г нитрата железа $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ в 60 мл воды и 40 мл уксусной кислоты.
Методика. Пластинку опрыскивают смесью растворов а) и б) (1:1), сушат 10 мин при 110°C и опрыскивают смесью 45 мл раствора в) с 6 мл концентрированной соляной кислоты.
Применение. Обнаружение сложных эфиров [226], ацетатов сахаров [43], лактонов [209].
- T-145. 8-Оксихинолин
Реактив. 10 %-ный раствор 8-оксихинолина в этаноле, насыщенном аммиаком.
Применение. Обнаружение ионов молибдена, цинка, марганца, кобальта, железа, галлия [177, 247], хрома, никеля, алюминия [248, 249], щелочноземельных элементов.
- T-146. Иод
Реактив. а) Кристаллы иода помещают в герметичную камеру. Чтобы повысить давление паров иода, камеру можно нагреть.
 б) Насыщенный раствор иода в гексане [250].
Применение. Реактив общего назначения.
- T-147. Иод—азид натрия
Реактив. а) Раствор 3,5 г азидата натрия в 100 мл 0,1 н. раствора иода.
 б) 0,5 %-ный раствор крахмала.
Методика. Пластинку последовательно опрыскивают растворами а) и б) (лучшие результаты можно получить, опрыскивая смесью этих двух растворов [251]).
Применение. Обнаружение фенилтиогидантоинов [252], пенициллинов [253], эфиров тиофосфорной кислоты [254].
- T-148. Иод—иодид калия
Реактив. 5 %-ный раствор иода в смеси 10 %-ного раствора иодида калия, воды и 2 н. уксусной кислоты [2:3:5].
Применение. Обнаружение алкалоидов [51].
Примечание. Слой адсорбента с добавкой нитрата серебра следует предварительно опрыскать насыщенным раствором бромида калия [225]. При обнаружении стероидов используют 0,3 %-ный раствор иода в 0,5 %-ном растворе иодида калия [60]. Заключительное опрыскивание эфиром модифицирует реакции некоторых стероидов [256].
- T-149. Иодоплатинат
Реактив. Смесь 5 мл 10 %-ного раствора хлорида платины и 250 мл 2 %-ного раствора иодида калия.
Применение. Обнаружение алкалоидов и других азотсодержащих соединений, водорастворимых витаминов.
Предел обнаружения (на оксиде алюминия): 0,01 мкг витамина В₁; 0,20 мкг витамина С; 0,40 мкг никотиновой кислоты; 2,00 мкг биотина; 2,00 мкг холинхлорида; 0,40 мкг D-пантотената [257].
- T-150. Иодоплатинат (модифицированный)
Реактив. а) Смесь 1 мл 0,2 %-ного раствора хлорида платины, 0,1 мл 3—4 %-ной соляной кислоты и 20 мл ацетона (ч. д. а.).
 б) 20 %-ный раствор иодида калия.
Методика. Смешивают раствор а) с 0,1 мл раствора б) и опрыскивают смесью пластинку. Растворы а) и б) стабильны в течение нескольких недель. Смесь стабильна в течение одного дня.
Применение. Обнаружение пенициллинов [258].
Предел обнаружения: от 0,05 до 0,3 мкг обычных пенициллинов; чувствительность обнаружения пенициллиновых эфиров и сульфоксидов и пропенилпенициллинов несколько хуже, однако достаточно высока.

- Т-151. Изатин**
Реактив. 0,4 %-ный раствор изатина в концентрированной серной кислоте [259].
Методика. Опрыскивают пластинку, отмечают появление окрашенных пятен и нагревают несколько минут при 120°C.
Применение. Обнаружение производных тиофена.
- Т-152. Изатин—ацетат кадмия**
Реактив. В смеси 50 мл воды и 20 мл уксусной кислоты растворяют 0,5 г ацетата кадмия и доводят объем раствора пропанолом до 500 мл.
Методика. Отбирают необходимый объем раствора и добавляют изатин (с точностью ± 1 мг) в количестве, требуемом для получения 0,2 %-ного (масса/объем) раствора.
Применение. Обнаружение amino- и иминокислот. Пролин и оксипролин дают голубые пятна [260].
- Т-153. Изатин—ацетат цинка [135]**
Реактив. а) В смеси 100 мл изопропанола и 1 мл пиридина растворяют 1 г изатина и 1,5 г ацетата цинка.
 б) В смеси 1 мл уксусной кислоты, 95 мл изопропанола и 5 мл воды растворяют такие же количества тех же соединений. Растворение и в первом, и во втором случае проводят при нагревании на водяной бане при 70—80°C. После полного растворения твердой фазы раствор быстро охлаждают.
Методика. Пластинку обильно опрыскивают раствором а) или б) и сушат 30 мин при 90°C. Если нужно получить пятна с более четко различающейся окраской, то пластинки сушат 20 ч при комнатной температуре.
Применение. Обнаружение аминокислот [262].
- Т-154. Гидразид изоникотиновой кислоты**
Реактив. В 500 мл воды, содержащей 2,5 мл концентрированной соляной кислоты, растворяют 2 г изоникотиновой кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку оставляют на воздухе в некоторых случаях до 16 ч.
Применение. Обнаружение стероидов [263].
- Т-155. Реактив Кедде**
Реактив. Свежеприготовленная смесь равных объемов 2 %-ного метанольного раствора 3,5-динитробензойной кислоты и 2 н. водного раствора гидроксида калия.
Применение. Обнаружение стероидных гликозидов [264], гликозидов строфантуса (пурпурные пятна в видимом свете) [265].
- Т-156. Ацетат свинца**
Реактив. 25 %-ный раствор основного ацетата свинца.

- Применение.** Обнаружение флавоноидов [266].
- Т-157. Тетраацетат свинца**
Реактив. В 100 г ледяной уксусной кислоты растворяют 3 г красного оксида свинца, раствор оставляют на 2 ч, после чего фильтруют.
Применение. Обнаружение сахаров [267].
- Т-158. Реактив Либермана—Бухарда**
Реактив. 4 объема уксусного ангидрида смешивают с 1 объемом концентрированной серной кислоты (реактив можно использовать для опрыскивания слоев адсорбентов, к которым добавлен крахмал в качестве связующего) [18].
Применение. Обнаружение ненасыщенных стероидов.
- Т-159. Малахитовый зеленый**
Реактив. а) В 10 мл воды растворяют 1 г гидроксида калия и доводят объем раствора 95 %-ным этанолом до 100 мл.
 б) 1 мл насыщенного раствора оксалата малахитового зеленого в ацетоне растворяют в смеси 51 мл воды, 45 мл ацетона и 4 мл буферного раствора с рН 7 (реактив № 3581 фирмы Векман).
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и нагревают 5 мин при 150°C. Охлаждают, промывают ацетоном, чтобы удалить органические остатки, и опрыскивают раствором б) для обнаружения сульфита калия.
Применение. Обнаружение органических пестицидов, содержащих сульфитную группу [268] (белые пятна на голубом фоне).
- Т-160. Хлорид марганца (II)**
Реактив. 50 мг хлорида марганца ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) растворяют в смеси 15 мл воды и 0,5 мл концентрированной серной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10—15 мин при 100—110°C.
Применение. Обнаружение желчных кислот. Холестерин дает розовые пятна, которые обесцвечиваются в течение 5 мин. Окраска пятен желчных кислот, напротив, в течение этих 5 мин становится все более интенсивной. Все пятна при долгом пребывании пластинки на воздухе обесцвечиваются [269].
Предел обнаружения: 2 мкг желчных кислот; 1 мкг холестерина.
- Т-161. Нитрат ртути (I)**

- Реактив.** В концентрированной азотной кислоте растворяют 1 г нитрата ртути(I) и доводят объем раствора дистиллированной водой до 100 мл.
- Применение.** Обнаружение метиприлона, этинамата, карбромаля [270].
- T-162. *n*-Метоксibenзальдегид
- Реактив.** В 18 мл этанола растворяют 1 мл *n*-метоксибензальдегида и 1 мл серной кислоты [271].
- Методика.** Опрысканную пластинку нагревают до 110°C.
- Применение.** Обнаружение фенилгидразонов сахаров (желто-зеленые пятна, появляются через 2—3 мин), сахаров (зеленые, голубые или фиолетовые пятна, появляются через 10 мин).
- T-163. Метиленовый голубой
- Реактив.** 25 мг метиленового голубого растирают в ступке с небольшим количеством 0,05 н. серной кислоты, затем постепенно прибавляют кислоту и доводят объем раствора до 100 мл (держать в темноте).
- Методика.** Пластинки опрыскивают смесью равных объемов реактива и ацетона.
- Применение.** Обнаружение сульфатов стероидов [272].
- T-164. Метиленовый голубой (восстановленный)
- Реактив.** Смешивают 20 мл 0,001 М раствора метиленового голубого, 2 мл концентрированной серной кислоты и 1 г цинковой пыли. Смесь фильтруют через стеклянную вату.
- Применение.** Обнаружение хинонов (но не нафтохинонов) [196] (голубые пятна).
- T-165. Метилумбеллиферон
- Реактив.** а) 0,5 %-ный раствор иода в этаноле.
б) Раствор 0,075 г 4-метилумбеллиферона в 100 мл смеси 1:1 по объему этанола и воды. К раствору добавляют 10 мл 0,1 н. гидроксида аммония.
- Методика.** Пластинку опрыскивают раствором а), наблюдают появление пятен, опрыскивают раствором б) и рассматривают хроматограмму в УФ-свете.
- Применение.** Обнаружение фосфорорганических пестицидов [73].
- T-166. Реактив Миллона
- Реактив.** 5 г ртути растворяют в 10 г дымящей азотной кислоты и доводят объем раствора водой до 10 мл.
- Применение.** Обнаружение арбутина, гидрохинона, кофеина, барбитуратов [180].
- T-167. Молибденовая синь
- Реактив.** а) 40,11 г триоксида молибдена осторожно кипятят в 1010 мл 25 н. серной кислоты (не должны вы-

- деляться белые пары) до полного растворения. После охлаждения объем раствора доводят водой до 1 л.
- б) Кипятят [осторожно, как и при приготовлении раствора а)] 1,78 г порошка молибдена в 500 мл раствора а) в течение 15 мин, затем охлаждают до комнатной температуры, отделяют раствор от осадка и снова доводят его объемом до 500 мл.
- Методика.** Пластинку опрыскивают смесью растворов а), б) и воды (1:1:2). При надлежащем разбавлении этот раствор окрашен в желто-зеленый цвет. Если разбавление слишком велико, то раствор становится желтым, а если воды добавлено недостаточно, то голубым. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев.
- Применение.** Обнаружение фосфолипидов (голубые пятна на белом или голубовато-сером фоне) [274].
- Предел обнаружения:** 0,005 мкмоль/л.
- T-168. Морин (2',3,4',5,7-пентаоксифлавон)
- Реактив.** 0,005—0,05 %-ный раствор морина в метаноле.
- Методика.** Опрысканную пластинку сушат 2 мин при 100°C и сразу же рассматривают в УФ-свете.
- Применение.** Реактив общего назначения. Дает желто-зеленые флуоресцирующие пятна или ярко окрашенные пятна на флуоресцирующем фоне [52, 275].
- T-169. Нафталиновый черный (краситель для хроматограмм на сефадексе)
- Реактив.** 1 г нафталинового черного растворяют в 100 мл смеси 50 мл метанола, 40 мл воды и 10 мл ледяной уксусной кислоты.
- Методика.** По окончании элюирования пластинку с сефадексом покрывают фильтровальной бумагой (N3 MM фирмы Whatman), стараясь, чтобы под бумагу не попали пузырьки воздуха, сушат 30 мин при 80—90°C, затем погружают на 30 мин в кювету с красителем, после чего промывают пластинку в той же смеси растворителей, чтобы смыть избыток красителя [276].
- Применение.** Обнаружение белков.
- T-170. Нафталиновый черный (краситель для электрофореза)
- Реактив.** 0,25 г нафталинового черного растворяют в смеси 25 мл ледяной уксусной кислоты и 500 мл дистиллированной воды.
- Методика.** Пластифицированный слой крахмального геля погружают на 2 ч в реактив. Избыток красителя смывают 5 %-ной уксусной кислотой, пока промывная жидкость не станет бесцветной. При последней промывке, как указано в работе [277], к уксусной кислоте добавляют 50 % глицина.

- Применение.** Обнаружение белков.
- T-171. Нафторезорцин
Реактив. 200 мг нафторезорцина растворяют в смеси 100 мл этанола и 10 мл фосфорной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5—10 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение углеводов [278].
- T-172. Нафтохинон—хлорная кислота [279]
Реактив. 0,1 %-ный раствор 1,2-нафтохинон-2-сульфоно-вой кислоты в смеси этанол—60 %-ная хлорная кислота—40 %-ный формальдегид—вода (2:1:0,1:0,9).
Методика. Равномерно опрыскивают пластинку и сушат при 70—80°C, наблюдая за появлением цветных пятен. При чересчур длительном нагревании все пятна становятся коричнево-черными.
Применение. Обнаружение стеринов.
Предел обнаружения: 0,03 мкг холестерина.
- T-173. α -Нафтиламин
Реактив. В 100 мл этанола растворяют 1 г α -нафтиламина.
Применение. Обнаружение 3,5-динитробензоатов (желтые или оранжевые пятна) [280], 3,5-динитробензамидов [281], хлорированных пестицидов. В последнем случае реактив разбавляют в 10 раз этанолом и после опрыскивания облучают пластинку 30 с коротковолновым УФ-светом (цвет пятен от красновато-коричневого до красновато-желтого; на дневном свете окрашивание нестабильно) [93].
- T-174. N-(1-нафтил)этилендиамин (реактив Бреттона—Маршалла)
Реактив. а) 1 н. раствор соляной кислоты.
 б) 5 %-ный раствор нитрита натрия.
 в) 100 мг дигидрохлорида N-(1нафтил)этилендиамина растворяют в 100 мл воды.
Методика. Пластинку опрыскивают сначала раствором а), затем раствором б) и отмечают все появившиеся желтые пятна. Затем высушивают при 100°C, чтобы удалить избыток азотистой кислоты, и опрыскивают раствором в).
Применение. Обнаружение сульфонамидов (красновато-пурпурные пятна) [282].
Методика. Для обнаружения фолиевой кислоты пластинку облучают УФ-светом в течение 30 мин и затем опрыскивают реактивом.
Предел обнаружения: 0,2 мкг [129].
- T-175. Нильский голубой А (восстановленная форма)
Реактив. Смешивают 1 г цинковой пыли, 20 мл 0,001 М раствора нильского голубого А и 2 мл концентрирован-

- ной серной кислоты. Смесь фильтруют через стеклянную вату.
- Применение.** Обнаружение хинонов (особенно нафтохинонов) [196].
- T-176. Нингидрин—кадмий
Реактив. В смеси 50 мл воды и 20 мл уксусной кислоты растворяют 0,5 г ацетата кадмия и доводят объем смеси до 500 мл пропанолом. Отбирают нужное количество раствора, добавляют нингидрин (с точностью ± 1 мг) с таким расчетом, чтобы концентрация последнего составила 0,2 % (масса/объем).
Методика. Пластинку опрыскивают до тех пор, пока слой не сделается прозрачным. Нагревают 30 мин при 60°C и охлаждают. Запоминают окраску пятен и оставляют пластинку на ночь в атмосфере, не содержащей аммиака, после чего наблюдают изменение окраски пятен.
Применение. Обнаружение аминокислот и дипептидов [283].
- T-177. Нингидрин—коллидин
Реактив. 0,3 г нингидрина растворяют в смеси 95 мл изопропанола, 5 мл 2,4,6-коллидина и 5 мл уксусной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку сушат при 90°C.
Применение. Обнаружение аминокислот [169, 284], аминосугаров (голубые пятна) [83].
- T-178. Нингидрин—нитрат меди [285]
Реактив. а) 0,2 %-ный раствор нингидрина в смеси 50 мл абсолютного этанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл 2,4,6-коллидина.
 б) 1 %-ный раствор нитрата меди ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в абсолютном спирте.
Методика. Высушенную пластинку опрыскивают свежеприготовленной смесью 25 мл раствора а) и 1,5 мл раствора б) и нагревают 1,5—2 мин при 105°C.
Применение. Обнаружение аминокислот [286].
- T-179. β -Оцимен-2,4-динитрофенилгидразин
Реактив. а) 2 %-ный раствор β -оцимена в гексане. Непосредственно перед использованием раствор пропускают через колонку с флорисилом (10×100 мм на каждые 100 мл раствора).
 б) 2 %-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 30 %-ной хлорной кислоте.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и выдерживают 1 ч при комнатной температуре или нагревают 10—15 мин при 50°C, после чего опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение антиоксидантов (белые пятна на желто-коричневом фоне) [287].

Предел обнаружения: 1 нг ВНА.

T-180. *n*-Нитроанилин (диазотированный)

Реактив. а) 1 г *n*-нитроанилина растворяют в 200 мл 2 н. соляной кислоты.

б) 5 %-ный раствор нитрита натрия.

Методика. Раствор б) при перемешивании добавляют к 10 мл раствора а) до полного обесцвечивания. Полученной смесью опрыскивают пластинку. Окраску многих пятен можно усилить, опрыскивая пластинки раствором карбоната натрия [162]. Если проводится обнаружение пластификаторов, пластинку сначала опрыскивают 0,5 н. этанольным раствором гидроксида калия и нагревают 15 мин при 60°C, а затем опрыскивают диазотирующим раствором [164].

Применение. Обнаружение фенолов [162], пластификаторов [164], хлорокина [288], катехоламинов [289].

Предел обнаружения: 0,5 мкг катехоламинов; 0,003 мкг адреналина [214].

T-181. Фторборат *n*-нитробензилдиазония

Реактив. а) 1,5 н. раствор гидроксида натрия в метаноле.

б) 0,01 %-ный раствор фторбората *n*-нитробензилдиазония в ацетоне или в смеси равных объемов диэтилового эфира и метанола.

Методика. Пластинку последовательно опрыскивают реактивами а) и б).

Применение. Обнаружение фенольных соединений [290, 291], катехоламинов [292], арил-N-метилкарбаматов [293], индолов и имидазолов [292].

Предел обнаружения: 0,01—0,05 мкг катехоламинов; 0,1 мкг карбаматов; от 0,1 до 0,5 мкг фенольных соединений [293] и от 0,1 до 2 мкг индолов и имидазолов.

T-182. 4-(*n*-Нитробензил)пиридин

Реактив. а) 5 %-ный раствор *n*-толуолсульфонилхлорида в безводной смеси пиридина и толуола (1:1).

б) 2 %-ный раствор 4-(*n*-нитробензил)пиридина в ацетоне.

в) 1 М раствор карбоната натрия.

Методика. I. Пластинку опрыскивают раствором а), сушат на воздухе, затем опрыскивают раствором б), выдерживают 1 мин, нагревают 1 мин в потоке горячего воздуха и после этого опрыскивают тонко распыленным раствором в). Пятна соединений, реагирующих с реактивом, окрашены в голубой или пурпурный цвет.

II. Смешивают раствор 10—50 мкг спирта в 50 мкл ацетона с 50 мкл 15 %-ного раствора *n*-толуолсульфонилхлорида в пиридине и выдерживают 1,5 ч при 0°C. Наносят на тонкослойную пластинку с целлюлозой и элюируют смесью гексан—этилацетат (4:1) на 10-сантиметровый (по длине) участок пластинки. Высушивают пластинку на воздухе и обрабатывают далее, как описано выше, начиная с опрыскивания раствором б).

Применение. Обнаружение соединений, содержащих гидроксильные группы [294].

Предел обнаружения: микрограммовые количества соединений. Амино-, сложноэфирные и эфирные группы не мешают обнаружению; карбоксильные и фенольные группы мешают.

T-183. 4(*n*-Нитробензил)пиридин—тетраэтиленпентамин

Реактив. а) 2 %-ный раствор 4-(*n*-нитробензил)пиридина (фирма Aldrich) в очищенном ацетоне (к ацетону добавляют перманганат калия из расчета 1 г на 1 л, кипятят в течение часа с обратным холодильником, после чего перегоняют).

б) 10 %-ный раствор тетраэтиленпентамина (фирма Eastman Kodak, реактив № T5902) в очищенном ацетоне.

Методика. Сухую пластинку обильно опрыскивают раствором а), испаряют ацетон, нагревают пластинку 5 мин при 110°C в потоке воздуха и слегка опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение фосфорорганических пестицидов (голубые пятна на белом фоне; диазинон дает красные пятна).

Предел обнаружения: 0,5—2 мкг [295].

T-184. Триоксид азота (для диазотирования) [296]

Реактив. а) Свежеприготовленный раствор триоксида азота в толуоле. В сосуд наливают 10 мл 6 н. соляной кислоты и сверху 10 мл толуола, после этого медленно добавляют 10 мл водного раствора, содержащего 2 г нитрита натрия, и перемешивают смесь, чтобы ускорить экстракцию.

б) Толуольный раствор, содержащий 0,1 моля фенола и 0,2 моля амина на 100 мл, для проведения реакции с солями диазония.

Методика. Последовательно опрыскивают пластинку растворами а) и б).

Применение. Обнаружение 2,4-динитрофенильных производных аминокислот или ароматических аминов.

Предел обнаружения: 10⁻⁹ моля.

Т-185. 4-(4'-Нитробензил)пиридин

Реактив. а) 5 %-ный раствор 4-(4'-нитробензил)пиридина в ацетоне.

б) Разбавленный раствор гидроксида натрия.

Методика. Пластинку опрыскивают раствором а); пятна имеют фиолетовую окраску, которая усиливается при опрыскивании пластинки раствором б).

Применение. Обнаружение производных ацетиленов (поскольку реакция не специфична, этот метод обнаружения следует сочетать с УФ-спектроскопическим анализом) [297].

Т-186. Тетраоксид осмия

Методика. Пластинку обрабатывают парами тетраоксида осмия в герметичной камере [298]. Для обнаружения соединений с изолированными двойными связями достаточно 10 мин. для обнаружения соединений с сопряженными двойными связями необходим час и больше [182].

Применение. Обнаружение соединений с двойными связями. Реактив использовался в тонкослойной хроматографии липидов [298] и стероидов [182] (пятна цветом от коричневого до черного).

Т-187. Реакция индиго с озоном [299]

Реактив. 130 мг индиго растворяют в 1 мл концентрированной серной кислоты при нагревании на водяной бане в течение часа. Объем раствора доводят водой до 500 мл.

Методика. Пластинку выдерживают 15—20 мин в герметичной камере, в атмосфере которой содержится 10—15 % озона. Далее излишек озона удаляют, обдувая пластинку струей воздуха, и опрыскивают ее реактивом.

Применение. Обнаружение ненасыщенных соединений (белые, желтые или коричневые пятна на голубом фоне).

Т-188. Палладий—кальцеин

Реактив. Готовят 0,02 М раствор фосфатного буфера (NaH_2PO_4 — Na_2HPO_4 , 1:1), содержащий $1 \cdot 10^{-4}$ г-ион/л иона Pd^{2+} и $7,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л кальцеина (фирма G. F. Smith). Реактив готовят за 12 ч до использования.

Методика. Опрысканную пластинку рассматривают в УФ-свете

Применение. Обнаружение ионов металлов, разделенных в виде диэтилдитиокарбаматов [300].

Предел обнаружения: 0,1—1 нг.

Т-189. Хлорид палладия

Реактив. 0,5 %-ный раствор хлорида палладия в разбавленной соляной кислоте.

Применение. Обнаружение эфиров тиофосфорной кислоты (желтые пятна на светло-коричневом фоне) [179], фенотиазинов (разноцветные пятна) [301].

Предел обнаружения: <5 мкг.

Т-190. Параформальдегид—фосфорная кислота

Реактив. В 100 мл концентрированной фосфорной кислоты ($d=1,7$) растворяют 0,03 г параформальдегида. Раствор стабилен в течение недели [255].

Применение. Обнаружение алкалоидов.

Т-191. Иодная кислота—хлорная кислота

Реактив. 10 г иодной кислоты и несколько миллиграммов пентоксида ванадия растворяют в 100 мл 70 %-ной хлорной кислоты [302].

Методика. Пластинку высушивают и опрыскивают реактивом. Реактив перед использованием взбалтывают.

Применение. Обнаружение эфиров тиофосфорной кислоты.

Т-192. Иодная кислота—реактив Шиффа [108]

Реактив. а) В 100 мл 90 %-ной уксусной кислоты растворяют 0,5 г иодной кислоты.

б) Смешивают равные объемы охлажденного до 0°C 30 %-ного раствора метабисульфита натрия и 3 н. соляной кислоты.

в) 200 мг фуксина и 5 мл 10 %-ного раствора метабисульфита натрия растворяют в 85 мл воды. Раствору дают постоять 12 ч, затем обрабатывают его активным углем и фильтруют.

Методика. Пластинку слегка опрыскивают раствором а) и затем последовательно растворами б) и в), после чего нагревают 15 мин при 90°C.

Применение. Обнаружение ненасыщенных моноглицеридов (фиолетовые пятна), полиеновых кислот (серо-зеленые пятна).

Т-193. Фенол—серная кислота

Реактив. 3 г фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты растворяют в 95 мл этанола.

Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10—15 мин при 110°C. Более длительное нагревание может способствовать повышению интенсивности окраски.

Применение. Обнаружение углеводов (коричневые пятна) [62].

Т-194. Солянокислый *m*-фенилендиамин [220]

Реактив. 0,2 М раствор солянокислого *m*-фенилендиамина в 76 %-ном этаноле.

Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5 мин при 110°C и рассматривают в УФ-свете.

- Применение.** Обнаружение гексозо- и триозофосфатов [71].
- T-195. Фосфомолибденовая кислота
Реактив. а) 2—20 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле или метилцеллозольве.
 б) Для нейтральных адсорбентов готовят смесь 4 мл концентрированной соляной кислоты и 100 мл 10 %-ного раствора фосфомолибденовой кислоты в 95 %-ном этаноле [18].
Методика. I. Если адсорбент содержит гипс в качестве связующего, пластинку опрыскивают раствором а) и нагревают 20 мин при 100°C. (При обнаружении насыщенных триглицеридов пластинку перед опрыскиванием обрабатывают 5 мин парами иода.) Чтобы повысить интенсивность окраски пятен и ослабить фон, пластинку можно обработать парами аммиака [304].
 II. Если связующим служит крахмал, пластинку опрыскивают 10 %-ным раствором а), испаряют растворитель в токе горячего воздуха и нагревают при 100°C до появления фронта растворителя (10 мин или меньше) [18].
Применение. Реактив общего назначения; обычно используется для обнаружения липидов, стероидов и антиоксидантов.
Предел обнаружения: от 0,05 до 1 мкг терпенов; 1 мкг фенотиазина.
- T-196. Фосфомолибденовая кислота—хлорид олова(II) [144]
Реактив. а) 1 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в смеси хлороформ—этанол (50 : 50).
 б) 1 %-ный раствор хлорида олова(II) в 2 н. соляной кислоте.
Методика. Слой адсорбента стабилизируют диметилдихлорсиланом (см. реактив T-71, ацетат меди—дитиооксамид), опрыскивают раствором а), промывают пластинку в проточной воде и погружают в раствор б).
Применение. Обнаружение фосфолипидов.
- T-197. Фосфовольфрамовая кислота
Реактив. 10 %-ный раствор фосфовольфрамовой кислоты в 90 %-ном этаноле.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 15 мин при 90—100°C.
Применение. Обнаружение холестерина и его эфиров (красные пятна на белом фоне) [108].
Предел обнаружения: 2—4 мкг.
- T-198. *o*-Фталевый альдегид—меркаптоэтанол
Реактив. а) Раствор, содержащий 0,1 % *o*-фталевого альдегида и 0,1 % 2-меркаптоэтанола в ацетоне. В тем-
- ноте при комнатной температуре раствор стабилен в течение нескольких дней.
 б) 1 %-ный раствор триэтиламина в ацетоне
Методика. Обильно опрыскивают пластинку раствором а), выжидают 5 мин, опрыскивают раствором б), выжидают 10 мин и рассматривают хроматограмму в УФ-свете (350 ммк).
Применение. Обнаружение аминокислот и пептидов. На силикагеле при комнатной температуре пятна через несколько минут исчезают, а на целлюлозе они сохраняются несколько дольше. Для обнаружения пролина пластинку нагревают при 100°C в течение часа (при этом все остальные пятна исчезают). Для обнаружения соединений с N-защитными группами (*трет*-бутилоксикарбонильной, 2-фенилизопропилоксикарбонильной и *n*-метоксибензоилоксикарбонильной) пластинку перед опрыскиванием сушат 2 ч при 100°C. При этом удается обнаруживать вещества, концентрация которых составляет 500 пмоль/л.
Предел обнаружения: от 50 до 100 пмоль аминокислот. На силикагеле чувствительность выше в 2—5 раз, однако ароматические аминокислоты (в особенности цистин) легче обнаруживаются на целлюлозе [305].
- T-199. Ропсеау S (краситель для пластинок с сефадексом)
Реактив. 0,2 %-ный раствор Ропсеау S в 10 %-ной уксусной кислоте.
Методика. Пластинку выдерживают в реактиве 30 мин и промывают водой. Подробнее эта методика описана выше (см. T-128, нафталиновый черный).
Применение. Обнаружение белков [276].
- T-200. Феррицианид калия—гидроксид калия
Реактив. а) 0,1 %-ный раствор феррицианида калия.
 б) 15 %-ный раствор гидроксида калия.
Методика. Пластинку опрыскивают смесью, содержащей 1,5 мл раствора а), 10 мл раствора б) и 20 мл воды. Хроматограмму рассматривают в длинноволновом УФ-свете до и после опрыскивания и нагревания.
Применение. Обнаружение катехоламинов [306].
- T-201. Феррицианид калия—хлорид железа(III)
Реактив. а) Раствор, содержащий 0,2 % феррицианида калия и 0,01 % гексагидрата хлорида железа(III) в 2 н. соляной кислоте [307].
 б) Смесь 0,1 М растворов хлорида железа и 0,1 М феррицианида калия (1 : 1).
Применение. Обнаружение: а) 2,4-динитрофенилгидразонов; скорость развития и изменения окраски зависит от

- соединения (см. первоисточники), б) ароматических аминов [222].
- T-202. Феррицианид калия—железоаммониевые квасцы [303]
Реактив. а) 0,1 %-ный раствор феррицианида калия в 0,25 %-ном растворе карбоната натрия.
 б) 200 мг железоаммониевых квасцов растворяют в 100 мл воды и добавляют 5 мл 85 %-ной фосфорной кислоты.
Методика. Опрыскивают пластинку раствором а), нагревают 30 мин при 80°C, охлаждают и опрыскивают реактивом б).
Применение. Обнаружение стероидов [60].
Предел обнаружения: от 2 до 5 мкг.
- T-203. Ферроцианид калия
Реактив. 1 %-ный раствор ферроцианида калия.
Применение. Обнаружение урана и железа [247], меди и ртути [246].
- T-204. Гидроксид калия
Реактив. а) Смесь 5 %-ного раствора гидроксида калия с ацетоном (2:1) [309].
 б) 2 н. спиртовой раствор гидроксида калия [308].
Методика. I. Опрыскивают пластинку раствором а) или б) и нагревают до 80—100°C.
 II. При обнаружении неацетилованных цитратов пластинку сначала опрыскивают смесью уксусный ангидрид—концентрированная фосфорная кислота—диоксан (5:0,5:5) и нагревают 30 мин при 100°C, после чего охлаждают и обрабатывают пластинку, как указано в методике I.
Применение. Обнаружение ароматических нитросоединений и аминов [309], ацетилованных и неацетилованных цитратов [308] (желтые флуоресцирующие пятна).
- T-205. Гипохлорит калия—*о*-толуидин (реактив Рейнделя-Хоппе, модифицированный по Грейгу и Либеку) [310]
Реактив. а) Раствор 2 г гипохлорита калия в 100 мл воды.
 б) Насыщенный раствор *о*-толуидина в смеси 2 %-ной уксусной кислоты и 85 %-ного раствора иодида калия (1:1).
Методика. Пластинку слегка опрыскивают раствором а), дают постоять 1—1,5 ч и опрыскивают раствором б).
Применение. Обнаружение аминокислот [262] (синие черные пятна на белом фоне).
- T-206. Иодид калия—аммиак—сероводород [249]
Реактив. 2 %-ный раствор иодида калия

- Методика.** Пластинку опрыскивают реактивом, высушивают и обрабатывают вначале парами аммиака, затем газообразным сероводородом.
Применение. Обнаружение неорганических ионов группы сероводорода.
- T-207. Иодид калия—крахмал
Реактив. а) Смесь 4 %-ного раствора иодида калия с уксусной кислотой (1:4) (для обесцвечивания реактива добавляют по каплям 1 %-ный раствор сульфата натрия).
 б) 1 %-ный раствор крахмала.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и через 5 мин раствором б).
Применение. Обнаружение пероксидов [311] (голубые пятна).
- T-208. Иодовисмутат калия
Реактив. а) В 80 мл воды растворяют 1,7 г нитрата висмута и 20 г винной кислоты.
 б) В 40 мл воды растворяют 16 г иодида калия.
 в) Смешивают растворы а) и б) (1:1).
 г) В 50 мл воды растворяют 10 г винной кислоты и добавляют 10 мл раствора в) (готовят ежедневно свежую смесь).
Методика. Пластинку опрыскивают раствором г) и обрабатывают парами брома.
Применение. Обнаружение фунгицидов [312].
Предел обнаружения: 0,25—0,6 мкг.
- T-209. Иодоплатинат калия
Реактив. Смешивают 2 мл 10 %-ного раствора хлорида платины и 25 мл 8 %-ного раствора иодида калия и доводят объем раствора водой до 100 мл
Применение. Обнаружение алкалоидов [169], фенотиазинов [218], биотина [161], липидов [313].
Предел обнаружения: 10 мкг алкалоидов, от 4 до 10 мкг липидов.
- T-210. Перманганат калия (кислый)
Реактив. Смешивают равные объемы 0,1 н. раствора перманганата калия и 2 н. уксусной кислоты [51].
Применение. Реактив общего назначения.
- T-211. Перманганат калия (щелочной)
Реактив. Свежеприготовленная смесь 2 %-ного раствора перманганата калия и 4 %-ного раствора бикарбоната натрия (1:1).
Применение. Реактив общего назначения.
Предел обнаружения: 2 мкг стероидов [60].
- T-212. Перманганат калия

- Реактив.** 0,25—2 %-ный водный раствор перманганата калия.
Применение. Реактив общего назначения.
- T-213. Перманганат калия—серная кислота
Реактив. В 15 мл концентрированной серной кислоты растворяют 0,5 г перманганата калия [22]
 (Раствор можно готовить только в небольших количествах, так как гептаоксид марганца взрывоопасен.)
Применение. Реактив общего назначения (белые пятна на розовом фоне).
Предел обнаружения: 1 мкг фосфиноксидов.
- T-214. Перманганат калия—бромфеноловый синий [314]
Реактив. а) 0,5 %-ный раствор перманганата калия.
 б) 0,2 %-ный водный раствор бромфенолового синего.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и через 10—15 мин раствором б).
Применение. Реактив общего назначения.
Предел обнаружения: 0,1 мкг амаромицина (в 10 раз чувствительнее, чем при использовании одного перманганата калия).
- T-215. Тиокарбонат калия
Методика. Пластинку опрыскивают реактивом и наблюдают появление разноцветных пятен.
Применение. Обнаружение ионов металлов [315].
Предел обнаружения: от 0,7 мкг рутения(III) до 12,1 мкг сурьмы(III).
- T-216. Пирен
Реактив. 0,05 %-ный раствор очищенного пирена (фенантрена) в петролейном эфире (т. кип. 60—80°).
Методика. Пластинку со слоем силикагеля опрыскивают реактивом и рассматривают в УФ-свете. Силикагель ослабляет зеленую флуоресценцию пирена, однако желчные кислоты нейтрализуют действие силикагеля и в местах их расположения наблюдаются зеленые флуоресцирующие пятна. Метод неdestructивный: отметив положение пятен, можно проявить пластинку в течение 0,5 ч смесью диэтилового и петролейного эфира (т. кип. 60—80°С) и переместить пирен на линию фронта растворителя.
Применение. Обнаружение желчных кислот [316].
Предел обнаружения: 0,2 мкг желчных кислот; 0,1 мкг солей желчных кислот.
- T-217. Пирокатехиновый фиолетовый (пирокатехинсульффталин)
Реактив. В 100 мл этанола растворяют 100 мг пирокатехинового фиолетового.

- Методика.** Пластинку облучают УФ-светом 20 мин, после чего опрыскивают реактивом [317].
Применение. Обнаружение оловоорганических соединений (темно-синие или фиолетовые пятна на светлом серо-коричневом фоне).
- T-218. 1-(2-Пиридилазо)-2-нафтол [278]
Реактив. а) 0,4 %-ный раствор 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола в этаноле.
 б) Раствор 0,8 г нитрата кобальта в 100 мл воды.
 в) 2 М буферный раствор ацетата натрия, не содержащего железа (рН 4,6).
 г) Смешивают 4 мл раствора б) и 2 мл раствора в) и доводят объем смеси водой до 50 мл.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают и опрыскивают раствором г).
Применение. Обнаружение глюкозидуронатов (фиолетовые пятна на желтом фоне).
- T-219. 1-(2-Пиридилазо)-2-нафтол
Реактив. 0,25 %-ный раствор 1-(2-пиридилазо)-2-нафтола в этаноле.
Применение. Обнаружение иона UO_2^{2+} [248].
Предел обнаружения: 1 мкг.
- T-220. Кверцетин
Реактив. 0,01 М раствор кверцетина.
Применение. Обнаружение ионов титана, циркония, тория, молибдена, вольфрама, урана, железа.
Предел обнаружения: от 0,02 до 4,20 мкг [318].
- T-221. Резорцин—серная кислота
Реактив. а) 20 %-ный раствор резорцина в этаноле (с небольшой добавкой хлорида цинка).
 б) 4 н. серная кислота.
Методика. I. Опрыскивают пластинку раствором а), нагревают 10 мин при 150°С, опрыскивают раствором б) и нагревают 20 мин при 120°С. После этого опрыскивают 40 %-ным раствором гидроксида калия [164].
 II. Опрыскивают пластинку смесью равных объемов растворов а) и б) и нагревают 10 мин при 120°С. Затем охлаждают и обрабатывают парами аммиака [308].
Применение. Обнаружение пластификаторов (эфиры фталевой кислоты).
Предел обнаружения: 20 мкг.
- T-222. Родамин В
Реактив. а) 0,05 %-ный раствор родамина В в этаноле [35]
 б) 0,2 %-ный водный раствор родамина В [319].

- Методика.** I. Опрыскивают пластинку реактивом и рассматривают в видимом и УФ-свете (обработка 3 %-ным раствором пероксида водорода повышает интенсивность окраски пятен) [320]. Для обнаружения гербицидов (галогензамещенных феноксикислот) применяют 0,02 %-ный раствор реактива [103], а для карбаматов и гербицидов на основе мочевины — 0,005 %-ный раствор [175]. II. Для обнаружения глицеридов пластинку опрыскивают реактивом а) и затем 10 н. раствором гидроксида калия (в некоторых случаях чувствительность обнаружения повышается, если через несколько минут провести опрыскивание раствором гидроксида калия повторно [35]).
- Применение.** Обнаружение пищевых консервантов (пятна с окраской от розовой до пурпурной; окраска усиливается при опрыскивании 3 %-ным раствором пероксида водорода [320]), липидов (пурпурные пятна на розовом фоне [319]), глицеридов (светлые пятна на розово-красном или кроваво-красном фоне [35]), гербицидов [103, 175].
- Предел обнаружения:** от 0,3 до 1,5 мкг гербицидов.
- T-223. Роданин
Реактив. Спиртовой раствор роданина.
Методика. Пластинку опрыскивают реактивом и затем концентрированным раствором гидроксида аммония или натрия [1].
Применение. Обнаружение полиеновых альдегидов.
Предел обнаружения: 0,03 мкг.
- T-224. Ацетат серебра
Реактив. 1 %-ный раствор ацетата серебра.
Методика. Пластинку высушивают на воздухе 10—30 мин, опрыскивают реактивом и высушивают снова.
Применение. Обнаружение барбитуратов (матово-белые пятна) [321].
Предел обнаружения: 0,5 мкг.
- T-225. Нитрат серебра—гидроксид аммония—метоксид натрия [322]
Реактив. а) Раствор 300 мг нитрата серебра в 100 мл метанола.
 б) Насыщенный раствор аммиака в метаноле.
 в) Раствор 7 г металлического натрия в 100 мл метанола.
Методика. Пластинку опрыскивают смесью растворов а), б) и в), взятых в соотношении 5 : 1 : 2.
Применение. Обнаружение ацильных производных сахаров [323].
- T-226. Нитрат серебра (аммиачный)
Реактив. К 0,1—0,5 н. раствору нитрата серебра добавляют гидроксид аммония до полного растворения осадка.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10 мин при 110—120°C. Может понадобиться также 10-минутное облучение УФ-светом.
Применение. Обнаружение хлорзамещенных гербицидов [324], соединений с α -гликолевыми группами [325], терпеновых фенолов [162], ионов галогенидов (кроме фторида) [101], серосодержащих анионов [326], арсенатов, фосфатов, фосфитов, арсенитов [219], сахаров-восстановителей [327]. (Раствор должен быть свежим; его нельзя долго хранить, так как при этом могут образоваться чувствительные взрывоопасные компоненты. Не следует подвергать раствор воздействию прямого солнечного света [328].)
- T-227. Нитрат серебра (в присутствии азотной кислоты)
Реактив. а) 1 %-ный раствор нитрата серебра в 3 н. азотной кислоте [329].
Методика. Опрысканную пластинку сушат 5 мин при 80°C и подвергают действию дневного света в течение 10—15 ч.
Применение. Обнаружение гербицидов.
- T-228. Нитрат серебра—дифенилкарбазон
Реактив. а) 1 %-ный раствор нитрата серебра.
 б) 0,1 %-ный раствор дифенилкарбазона в 95 %-ном этаноле.
Методика. Пластинку опрыскивают последовательно растворами а) и б).
Применение. Обнаружение барбитуратов [330] (пурпурно-синие пятна).
- T-229. Нитрат серебра—бромфеноловый синий
Реактив. а) 0,5 %-ный раствор нитрата серебра в этаноле (масса/объем).
 б) Раствор, содержащий 0,2 % бромфенолового синего и 0,15 % нитрата серебра в смеси этанол—этилацетат (1 : 1).
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают 5 мин при 100°C, далее опрыскивают раствором б) и сушат 10 мин при той же температуре.
Применение. Обнаружение хлорированных пестицидов [331] (желтые пятна на голубом фоне), карбоксина и других фунгицидов [332].
- T-230. Нитрат серебра—формальдегид
Реактив. а) 0,05 н. раствор нитрата серебра.
 б) 37 %-ный раствор формальдегида.

в) 2 н. раствор гидроксида калия.

г) Смесь концентрированной азотной кислоты с 30 %-ным пероксидом водорода (1:1).

Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают, опрыскивают раствором б) и затем еще влажную пластинку опрыскивают раствором в). Сушат 30 мин при 130—135°C, охлаждают, опрыскивают раствором г) и оставляют на свету или облучают УФ-светом.

Применение. Обнаружение пестицидов [333].

T-231. Нитрат серебра—феноксизетанол [334]

Реактив. Растворяют 0,1 г нитрата серебра (в разных работах — от 0,425 до 1,7 г) в 1 мл воды, добавляют 10 мл 2-феноксизетанола, доводят объем смеси до 200 мл уксусной кислотой (ч. д. а.) и добавляют 3 капли 30 %-ного пероксида водорода. Реактив хранят в темноте.

Методика. Опрысканную пластинку сушат 5 мин под тягой при комнатной температуре и 15 мин при 75°C. Далее ее облучают УФ-светом в течение минимального необходимого промежутка времени, контролируя время появления пятен по стандартам (не более 15 мин для силикагеля и 50 мин для оксида алюминия). Пластинки необходимо предварительно промыть, чтобы удалить мешающие определению хлориды [335].

Применение. Обнаружение хлорированных пестицидов.

Предел обнаружения: 0,01—0,1 мкг.

T-232. Бихромат натрия—серная кислота

Реактив. В смеси 20 мл воды и 10 мл концентрированной серной кислоты растворяют 3 г бихромата натрия [22].

Применение. Реактив общего назначения.

T-233. Гидроксид натрия

Реактив. 2 %-ный раствор гидроксида натрия в 90 %-ном этаноле.

Применение. Обнаружение 2,4-динитрофенилгидразонов [336].

Предел обнаружения: <0,1 мкг.

T-234. Молибдат натрия

Реактив. В 100 мл 3—4 н. соляной кислоты растворяют 10 г молибдата натрия, а в 100 мл воды растворяют 1,0 г солянокислого гидразина. Смешивают эти два раствора, нагревают на кипящей водяной бане 5 мин, охлаждают и доводят объем смеси до 1 л. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев.

Применение. Обнаружение фосфолипидов [337].

T-235. 1,2-Нафтохинон-4-сульфонат натрия (реактив НХС)

Реактив. а) 1 н. раствор гидроксида натрия.

б) Насыщенный раствор 1,2-нафтохинон-4-сульфоната натрия в смеси этанол—вода (1:1).

Методика. Пластинку последовательно опрыскивают растворами а) и б).

Применение. Обнаружение триазидов биуретиков (стабильные оранжевые пятна, появляющиеся в течение 15 мин); основные соединения с первичными аминогруппами или реакционноспособными метиленовыми группами. Барбитураты не реагируют [338].

T-236. Нитрит натрия—β-нафтол

Реактив. а) Свежеприготовленный 1 %-ный раствор нитрита натрия в 0,1 н. соляной кислоте.

б) 0,2 %-ный раствор β-нафтола в 0,1 н. гидроксида натрия.

Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и сушат 5 мин при 100°C, после чего опрыскивают раствором б).

Применение. Обнаружение сульфонамидов [339], ароматических аминов [222, 340].

T-237. Нитропруссид натрия

Реактив. а) 0,5 %-ный раствор нитропруссид натрия.

б) 10 %-ный раствор нитрита натрия.

Методика. Пластинку последовательно опрыскивают растворами а) и б), высушивают и опрыскивают ледяной уксусной кислотой. Окраска полученных пятен меняется при обработке пластинок парами аммиака.

Применение. Обнаружение пиразолов [341].

T-238. Нитропруссид натрия—ацетальдегид

Реактив. а) 5 %-ный раствор нитропруссид натрия в 10 %-ном уксусном альдегиде.

б) 1 %-ный раствор карбоната натрия.

Методика. Пластинку опрыскивают смесью растворов а) и б) (1:1).

Применение. Обнаружение вторичных ароматических аминов, а также морфолина и диэтанолamina [342].

T-239. Нитропруссид натрия—феррицианид калия

Реактив. а) 10 %-ный раствор гидроксида натрия.

б) 10 %-ный раствор нитропруссид натрия.

в) 10 %-ный раствор феррицианида калия.

Методика. Равные объемы растворов а), б) и в) смешивают с тремя объемами воды, выдерживают 30 мин и полученной смесью опрыскивают пластинку. Смесь стабильна в течение нескольких недель при хранении в холодильнике.

- Применение.** Обнаружение производных цианамиды, аргинина, креатина, креатинина и т. п. [262]. Стрептомицины и неомидины дают ярко-красные пятна на желтоватом фоне [343].
- T-240. Пентацианоферрат натрия (реактив Феррона)
Реактив. а) 1 %-ный раствор пентацианоферрата натрия в воде.
 б) 20 %-ный раствор гидроксида натрия.
Методика. Смешивают 15 мл раствора а) и 5 мл раствора б) и добавляют каплю 30 %-ного пероксида водорода. Раствор стабилен 24 ч.
Применение. Обнаружение диуретиков [344].
- T-241. Периодат натрия—бензидин
Реактив. а) 0,1 %-ный раствор метапериодата натрия.
 б) 0,5 %-ный раствор бензидина в смеси бутанол—уксусная кислота (4:1).
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и через 4 мин раствором б).
Применение. Обнаружение соединений двухвалентной серы [345] (белые пятна на темно-синем фоне).
Предел обнаружения: от 5 до 10 мкг DL-метионина; 20—30 мкг ароматических серосодержащих соединений.
- T-242. Периодат натрия—бензидин—нитрат серебра [346]
Реактив. а) 0,1 %-ный раствор метапериодата натрия.
 б) Готовят смесь 70 мл воды, 30 мл ацетона и 1,5 мл 1 н. соляной кислоты и смешивают ее с раствором 2,8 г бензидина в 80 мл 95 %-ного этанола.
 в) 1 мл насыщенного раствора нитрата серебра добавляют при перемешивании к 20 мл ацетона. Далее до полного растворения осадка по каплям добавляют воду.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают на воздухе и опрыскивают раствором б). Опрысканную пластинку помещают в камеру, насыщенную парами аммиака, выдерживают 5 мин и опрыскивают раствором в).
Применение. Обнаружение сахаров [346].
- T-243. Периодат натрия—реактив Шиффа [347]
Реактив. а) 0,5 %-ный раствор периодата натрия.
 б) 0,5 %-ный раствор *n*-розанилина, обесцвеченный диоксидом серы.
 в) 1 %-ный раствор хлорной кислоты.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), выдерживают 5 мин, обрабатывают еще влажный слой газообразным диоксидом серы, опрыскивают раствором б), выжидают 1 ч и опрыскивают раствором в), чтобы обесцветить фон.
- Применение.** Обнаружение фосфо- и гликолипидов [210] (синие или пурпурные пятна на желтоватом фоне).
- T-244. Пирофосфат натрия—диметиламинобензальдегид
Реактив. а) Раствор, содержащий 2—4 мг/мл пирофосфата натрия в 30 %-ном перексиде водорода.
 б) Смесь уксусный ангидрид—петролейный эфир (т. кип. 80—100°C)—бензол (1:4:5).
 в) Модифицированный реактив Эрлиха. Раствор 1 г диметиламинобензальдегида в 70 мл этанола смешивают с 30 мл карбитола (моноэтиловый эфир диэтиленгликоля) и 1,5 мл концентрированной соляной кислоты.
Методика. Пластинку сушат на воздухе, опрыскивают раствором а), нагревают 15 мин при 90—100°C, охлаждают, опрыскивают раствором б), снова нагревают и после охлаждения опрыскивают реактивом в). (При обнаружении соединений, содержащих N—O, реактивом а) пластинку не опрыскивают!)
Применение. Обнаружение пирролизидиновых алкалоидов [348]. Обнаруживаются только алкалоиды с ненасыщенным (3-пирролиновым) кольцом.
Предел обнаружения: ~0,2 мкг; 1—20 мкг эфирных алкалоидов, содержащих 3-пирролиновое кольцо.
- T-245. Вольфрамат натрия—трихлоруксусная кислота
Реактив. а) Смесь 6 мл 10 %-ного раствора вольфрамата натрия, 6 мл 5 %-ной трихлоруксусной кислоты и 3 мл 0,5 н. соляной кислоты.
 б) Свежеприготовленный 5 %-ный раствор нитрита натрия.
 в) 0,05 %-ный раствор гидроксида натрия.
Методика. Раствор б) приливают к раствору а) и опрыскивают пластинку смесью; выжидают 3 мин и опрыскивают пластинку раствором в). (Пластинки с полиамидным порошком сушат при 30°C в течение нескольких минут, чтобы удалить воду перед вторым опрыскиванием.)
Применение. Обнаружение фенольных соединений; *o*-диоксисоединения (кроме кверцетина) после второго опрыскивания окрашиваются в красный цвет. Фенол, нарингин и гесперидин не реагируют [349].
- T-246. Хлорид олова(II)
Реактив. а) В 10 мл концентрированной соляной кислоты растворяют 5 г хлорида олова(II) и доводят объем раствора водой до 35 мл.
 б) 1 %-ный раствор β -нафтола в 2 н. растворе гидроксида натрия.

- Методика.** Сухую пластинку опрыскивают раствором а), обрабатывают окислами азота и опрыскивают раствором б).
- Применение.** Обнаружение метанола в этаноле (разделение в виде 2,4-динитробензоатов); реактив пригоден также для обнаружения других спиртов в виде 2,4-динитробензоатов [351].
- Предел обнаружения:** 0,04 мкг метанола.
- T-247. Хлорид олова(II)—соляная кислота
- Реактив.** а) 10 %-ный раствор хлорида олова(II) в концентрированной соляной кислоте.
б) Раствор а) разбавляют в 200 раз 0,5 М серной кислотой.
- Методика.** I. Для обнаружения ароматических нитро соединений опрыскивают пластинку раствором а).
II. Для обнаружения триозо- и гексозофосфатов пластинку вначале обрабатывают реактивом Т-15, согласно описанной выше методике, а затем еще теплую поверхность опрыскивают раствором б).
- T-248. Хлорид олова(II)—моноклоруксусная кислота
- Реактив.** В 90 мл хлороформа растворяют 5 г хлорида олова(II) и 5 г моноклоруксусной кислоты.
- Методика.** Опрысканную пластинку нагревают 3 мин при 100°C.
- Применение.** Обнаружение терпенов [353].
- Предел обнаружения:** 0,5—2 мкг.
- T-248a. Судан черный В
- Реактив.** 0,7 %-ный раствор судана черного В в 85 %-ном этиленгликоле.
- Методика.** Слой геля погружают в реактив на 5 ч и промывают в течение часа не менее чем в пяти сменах 70 %-ного раствора гликоля. (**Примечание.** Если проводится также общее обнаружение белков по реакции Т-181а, то пластинку вначале следует обработать по методике Т-248, а затем уже по методике Т-181а.)
- Применение.** Обнаружение липопротеинов на полиакриламидных гелях [186а].
- T-249. Сульфаниловая кислота (диазотированная) (реакция Паули)
- Реактив.** а) Раствор 0,5 % по сульфаниловой кислоте и 0,5 % по нитриту натрия в 1 н. соляной кислоте.
б) 1 н. раствор гидроксида калия.
- Методика.** Пластинку опрыскивают последовательно растворами а) и б).
- Применение.** Обнаружение фенолов [354], ароматических аминов [288], фенилозаонов сахаров [355], катехоламинов [214].
- T-250. Дубильная кислота
- Реактив.** Смешивают 3 мл 85 %-ной фосфорной кислоты, 1 мл 0,33 %-ного раствора дубильной кислоты (USP) в уксусной кислоте (масса/объем) и 26 мл ацетона. Смесь готовят непосредственно перед использованием.
- Методика.** Опрысканную пластинку нагревают 15 мин при 80—90°C.
- Применение.** Реакция позволяет разделить пиретрины (розовые пятна) и пиперонилбутоксины (синие или синеватые пятна) [356].
- Предел обнаружения:** от 0,5 до 1 мкг пиретрина
- T-251. Этиловый эфир тетрабромфенолфталеина
- Реактив.** а) Исходный раствор, содержащий 1 г этилового эфира тетрабромфенолфталеина в 100 мл ацетона.
б) 10 мл раствора а) растворяют в ацетоне и доводят объем ацетоном до 50 мл.
в) 0,5 г нитрата серебра растворяют в 25 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора ацетоном до 100 мл.
г) 5 г лимонной кислоты растворяют в 50 мл воды и доводят объем раствора ацетоном до 50 мл.
- Методика.** Пластинку опрыскивают последовательно растворами б) и в), выжидают 2 мин и опрыскивают раствором г). На хроматограмме появляются синие или пурпурные пятна на желтом фоне. Через 10 мин хроматограмму вновь опрыскивают раствором г). Количественную обработку хроматограммы следует проводить в течение первых 10 мин после последнего опрыскивания, поскольку пятна постепенно обесцвечиваются.
- Применение.** Обнаружение остатков органических фосфор- и серосодержащих пестицидов [357].
- (**Примечание.** Перед хроматографированием пластинки следует промыть, чтобы удалить хлориды.)
- Предел обнаружения:** 0,05 мкг.
- T-252. Тетрацианэтилен
- Реактив.** а) Насыщенный раствор тетрацианэтилена в бензоле.
б) 2 %-ный раствор тетрацианэтилена в бензоле.
в) 0,5 %-ный раствор тетрацианэтилена в этилацетате.
- Методика.** Пластинку опрыскивают раствором в) и нагревают при 80°C.
- Применение.** Обнаружение углеводов, гетероциклических соединений, ароматических аминов и фенолов

- [используется раствор а)] [8, 238, 358], хлорфенолов и их эфиров, применяемых в качестве пестицидов [359] и сульфидов, сульфонов и сульфоксидов [360] [используется раствор б)].
Предел обнаружения: 0,5—1 мкг индолов.
- T-253. Тетрацианхинодиметанид [361]
Реактив. 0,5 %-ный раствор тетрацианхинодиметанида лития в смеси этанол—вода (1 : 1).
Методика. Опрысканную пластинку выдерживают 15—20 мин и рассматривают. Перед опрыскиванием сушат при 80°C или обрабатывают парами аммиака, если элюирование проводилось кислотными растворителями.
Применение. Обнаружение одно- и двухзарядных ионов металлов с большой молекулярной массой.
- T-254. N,N,N',N'-Тетраметил-4,4'-диаминодифенилметан—нитрат аммония-церия(IV)
Реактив. а) 0,25 %-ный раствор N,N,N',N'-тетраметил-4,4'-диаминодифенилметана в ацетоне.
 б) 1 %-ный раствор нитрата аммония-церия(IV) в 0,1 н. азотной кислоте.
Методика. Пластинку опрыскивают свежеприготовленной смесью растворов а) и б) (1 : 1) и нагревают 5 мин при 105°C.
Применение. Обнаружение полиспиртов [68] (белые или светло-голубые пятна на синем фоне).
- T-255. Тетразолиевый синий
Реактив. 0,5 %-ный раствор тетразолиевого синего в 2,5 н. растворе гидроксида натрия.
Применение. Обнаружение стероидов-восстановителей [362].
Предел обнаружения: 0,5—1 мкг [363].
- T-256. 4-(2-Тиазолилазо)резорцин
Реактив. 0,1 %-ный раствор 4-(2-тиазолилазо)резорцина в 95 %-ном этаноле.
Методика. Опрысканную пластинку обрабатывают 30 мин парами аммиака и высушивают 30—45 мин в токе воздуха при 40°C.
Применение. Обнаружение ионов никеля, меди, кобальта.
Предел обнаружения: 0,01—0,02 мкг [364].
- T-257. Тиобарбитуровая кислота—хлорид железа(III)
Реактив. а) В 100 мл 30 %-ной (объем/объем) серной кислоты растворяют 3 г бихромата натрия.
 б) В 100 мл воды растворяют 2,8 г 2-тиобарбитуровой кислоты и 2,12 г карбоната натрия.
 в) В 100 мл 1 %-ной (объем/объем) соляной кислоты растворяют 1 г хлорида железа(III).
Методика. Пластинку умеренно опрыскивают раствором а) (если опрыскать слабо, то окисление будет недостаточным, если чересчур обильно, то альдегиды подвергнутся разложению), через 30 с опрыскивают раствором б), нагревая 20 мин при 45°C, опрыскивают раствором в) и нагревают еще 15 мин при той же температуре. (При чересчур обильном опрыскивании растворами б) и в) на поверхности пластинки появляется коричневая вуаль.)
Применение. Обнаружение многоатомных спиртов [356].
Предел обнаружения: 100—300 мкг.
- T-258. Тимол—серная кислота
Реактив. а) 20 %-ный раствор тимола в этаноле.
 б) 4 н. серная кислота.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и нагревают 10 мин при 90°C, затем опрыскивают раствором б) и нагревают 10—15 мин при 120°C.
Применение. Обнаружение пластификаторов (разноцветные пятна) [164].
- T-259. Тимол—серная кислота
Реактив. В смеси 10 мл концентрированной серной кислоты и 190 мл этанола растворяют 1 г тимола.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 15—20 мин при 120°C.
Применение. Обнаружение углеводов [62] (ярко-розовые пятна, при дальнейшем нагревании переходящие в бледно-фиолетовые).
- T-260. *o*-Толуидин
Реактив. 0,5 %-ный раствор *o*-толуидина в этаноле (*o*-толуидин можно заменить на *o*-дианизидин).
Методика. Опрысканную пластинку высушивают и облучают коротковолновым УФ-светом.
Применение. Обнаружение хлорированных пестицидов [366] (зеленые пятна на белом фоне).
Предел обнаружения: 0,5—1 мкг.
- T-261. Толуидиновый синий—лизаминовый зеленый [367]
Реактив. а) Смесь формалина с метанолом (1 : 4).
 б) 0,1 %-ный раствор цетавлона в физиологическом солевом растворе.
 в) 0,04 %-ный раствор толуидинового синего в смеси воды с безводным ацетоном (1 : 4).
 г) Раствор 0,3 г лизаминового зеленого в 100 мл 1 %-ной уксусной кислоты.
Методика. Обнаружение пятен на слоях агарового геля: погружают пластинку на 15 мин в раствор а) и затем на 1 ч в раствор б), сушат при 37°C под фильтровальной

- бумагой, после этого погружают высушенную пластинку на 15 мин в раствор в) и промывают 1 %-ной уксусной кислотой до обесцвечивания фона. После этого обработанную таким образом пластинку погружают на 5 мин в раствор б) и снова промывают пластинку в уксусной кислоте.
- Применение.** Одновременное обнаружение мукополисахаридов (пурпурно-красные пятна) и белков (зеленые пятна).
- T-262. Трихлоруксусная кислота
Реактив. а) 4 %-ный (масса/объем) раствор трихлоруксусной кислоты в хлороформе.
 б) 25 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты в хлороформе.
Методика. При использовании раствора а) опрысканную пластинку выдерживают при комнатной температуре 10—30 мин. При применении раствора б) после опрыскивания пластинку нагревают 2 мин при 100°C и рассматривают в УФ-свете.
Применение. Обнаружение ментофурана [368] [раствор а), розовое пятно], гликозидов *Strophanthus* (строфантуса) [369] [раствор б), желтая флуоресценция]
Предел обнаружения: 0,4 мкг.
- T-263. Трихлоруксусная кислота—хлорамин Т [370]
Реактив. Свежеприготовленная смесь 25 %-ного раствора уксусной кислоты в 95 %-ном этаноле и 3 %-ного раствора хлорамина Т (4:1).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5—10 мин при 110°C и после этого рассматривают в видимом и УФ-свете.
Применение. Обнаружение карденолидов [34, 369, 371].
Предел обнаружения: 0,2 мкг.
- T-264 N,2,6-трихлор-*n*-хинонимин (реактив Гиббса)
Реактив. а) 2 г N,2,6-трихлор-*n*-хинонимина растворяют в 100 мл этанола.
 б) 10 %-ный раствор карбоната натрия.
 в) Модифицированный реактив: 0,1 %-ный раствор N,2,6-трихлор-*n*-хинонимина в смеси хлороформа с диметилсульфоксидом (9:1), предварительно насыщенной карбонатом натрия. Раствор стабилен 4 месяца; нестабилен в присутствии щелочных паров. Не следует пользоваться реактивом, если он потемнел или обесцветился.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают на воздухе и опрыскивают раствором б).
Применение. Обнаружение оксискатолов [137], фенолов (обычно *n*-замещенные фенолы не реагируют).
- Для обнаружения лекарственных препаратов многих классов применяют опрыскивание раствором в) Таким образом обнаруживают амфетамины, анестетики, антигистамины, барбитураты, деконгестанты, диуретики, наркотики, психотропные и сульфамидные препараты [372].
Предел обнаружения: субнанограммовые количества барбитуратов [270].
- T-266. 1,3,5-Тринитробензол
Реактив. а) 1 г гидроксида калия растворяют в 10 мл воды и доводят объем раствора 95 %-ным этанолом до 100 мл.
 б) Насыщенный раствор 1,3,5-тринитробензола в ацетоне.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а) и нагревают 5 мин при 150°C, затем охлаждают и промывают хроматограмму ацетоном, чтобы удалить органические примеси. После этого опрыскивают пластинку раствором б) для обнаружения сульфита калия.
Применение. Органические сульфитные пестициды [268] (розовые или красные пятна).
- T-267. Тринитробензолсульфоновая кислота
Реактив. 0,1 %-ный раствор 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты в смеси ацетон—этанол—вода (2:2:1).
Применение. Обнаружение аминокислот [373].
- T-268. Хлорид 2,3,5-трифенилтетразолия
Реактив. Свежеприготовленная смесь равных объемов метанольных растворов хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (4 %) и гидроксида натрия (1 н.).
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5—10 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение стероидов [263] (красные пятна).
- T-269. Нитрат уранила
Реактив. В 95 мл 10 %-ной (объем/объем) серной кислоты растворяют 5 г нитрата уранила [374].
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 6—7 мин при 110°C.
Применение. Обнаружение стероидов.
- T-270. Мочевина
Реактив. В 48 мл воды, насыщенной бутанолом, растворяют 1 г мочевины и добавляют 4,5 мл 85 %-ной ортофосфорной кислоты.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 30 мин при 105—110°C (интенсивные серо-голубые пятна на почти бесцветном фоне).
Применение. Обнаружение эфиров сахарозы [375].

- Предел обнаружения:** 0,3 мкг.
- T-271. Мочевина—1-нафтол—бром (реактив Сакагучи)
Реактив. а) Раствор, содержащий 16 % мочевины и 0,2 % α -нафтола в этаноле (5:1).
 б) В 500 мл 5 %-ного раствора гидроксида натрия растворяют 3,3 мл брома.
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), высушивают при 40°C и опрыскивают раствором б).
Применение. Специфичный реактив на гуанидиновую группу. Аргинин и гомоаргинин меняют цвет с розового на красный.
- T-272. Ванилин—фосфорная кислота
Реактив. 1 %-ный раствор ванилина в 50 %-ной фосфорной кислоте.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 10—23 мин при 120°C.
Применение. Обнаружение стероидов [25, 376].
- T-273. Ванилин—нитрат серебра
Реактив. а) В 100 мл этанола растворяют 3,0 г ванилина и добавляют 0,5 мл серной кислоты ($d=1,84$).
 б) Смесь 2,5 %-ного водного раствора нитрата серебра и 0,5 %-ного раствора бромфенолового синего в ацетоне (1:1).
Методика. Пластинку опрыскивают раствором а), сушат 5 мин при 90°C и опрыскивают раствором б). Сушат 10 мин на воздухе и затем 1,5 мин при 90°C.
Применение. Обнаружение производных аденина (розовые пятна на золотом фоне) [377].
Предел обнаружения: от 0,0001 до 0,05 микромоля аденина при проведении реакции непосредственно в месте нанесения пробы.
- T-274. Ванилин—серная кислота
Реактив. 0,5 %-ный раствор ванилина в смеси серной кислоты с этанолом (4:1) [378]. Раствор готовят ежедневно.
Методика. Опрысканную пластинку нагревают 5 мин при 100°C (при более продолжительном нагревании все пятна становятся коричневыми).
Применение. Обнаружение стероидов [378], терпенов [379], пластификаторов [164], карбаматных пестицидов [380].
Предел обнаружения: 5 мкг/см² стероидов.
- T-275. Хлорид цинка
Реактив. 30 %-ный раствор хлорида цинка в метаноле (раствор следует профильтровать) [195].

Методика. Опрысканную пластинку нагревают в течение часа при 105°C. При извлечении пластинки из сушильного шкафа следует покрыть ее стеклом, чтобы предотвратить сорбцию влаги. Хроматограмму рассматривают в УФ-свете (366 нм).

Применение. Обнаружение стероидов.

Предел обнаружения: 0,1 мкг или меньше.

T-276. Ацетат цинка-уранила

Реактив. Насыщенный раствор ацетата цинка-уранила в 2 н. уксусной кислоте.

Методика. Опрысканную пластинку рассматривают в УФ-свете (ярко флуоресцирующие пятна).

Применение. Обнаружение ионов натрия, лития (калий обнаруживается только при сравнительно высоких концентрациях [381]).

Необходимо помнить, что в некоторых случаях реакция на слое зависит от природы адсорбента. Например, при обнаружении кофеина путем обработки пластинки хлором с последующим опрыскиванием раствором иодида калия и бензидина реакция дает отрицательные результаты на силикагеле G и положительные на оксиде алюминия G [122]. Не следует забывать также, что приведенные данные по пределам обнаружения весьма относительны, поскольку чувствительность обнаружения с помощью данного реактива выше для соединений с меньшими R_f и ниже для соединений с большими R_f . При движении вещества по слою пятно расплывается, и в результате этого концентрация соединения на единицу площади при больших R_f меньше.

Одну и ту же хроматограмму можно опрыскивать несколькими разными реактивами. Для этого достаточно слегка опрыскать пластинку первым реактивом, удалить опрысканный слой с помощью липкой ленты и опрыскать пластинку другим реактивом [382]. Другой способ, особенно полезный в тех случаях, когда желательно избежать загрязнения пробы детектирующим реактивом, состоит в том, что на хроматограмму после проведения разделения накладывают лист фильтровальной бумаги [383] или другую хроматографическую пластинку [384] с тем, чтобы получить «отпечаток», который затем опрыскивают соответствующим реактивом.

В некоторых случаях для обнаружения дополнительных пятен пластинку последовательно обрабатывают несколькими реактивами. Так, можно обработать пластинку парами иода, отметить положение пятен, затем удалить иод в вакууме и обрабатывать пластинку другими реактивами [210]. Приведем еще один пример. Обнаружение органических пестицидов

проводят путем последовательного опрыскивания пластинки раствором иода в этаноле и растворами флуоресцеина, 4-метилумбеллиферона и нитрата серебра. После каждого опрыскивания снова рассматривают хроматограмму и отмечают происшедшие изменения.

4. РАДИОАКТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Авторадиограммы* можно получить, если наложить рентгеновскую фотопленку непосредственно на хроматографическую пластинку. Для этой цели вполне пригодна пленка No-Screen Medical X-ray Film фирмы Kodak. Продолжительность экспозиции, разумеется, зависит от активности присутствующих на пластинке веществ и может варьировать в интервале от 1 ч до 9 дней [385]. Шеппард и Циен [386] описали способ покрытия фотографических пластинок эмульсией типа NPВ (фирмы Kodak) для регистрации треков ядерных частиц с целью получения на этих пластинках авторадиограмм тонкослойных хроматографических пластинок. Иногда между пленкой и хроматографическим слоем помещают тонкую пластиковую пленку, однако при этом экспозицию приходится увеличивать [387]. Вместо рентгеновской пленки для той же цели можно использовать пленку типа 57 фирмы Polaroid [388, 389]. (См. разд. 6 гл. XI, где радиоактивные методы детектирования описаны более подробно.)

Радиоактивные соединения можно обнаруживать непосредственно на пластинках, используя торцовый счетчик Гейгера [390—392] или проточный газовый счетчик [393—395].

5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

Эти методы можно применять для обнаружения пятен разделенных антибиотиков. Суть биологического детектирования состоит в том, что хроматографическую пластинку приводят в контакт со слоем агара, инокулированным соответствующим микроорганизмом. На практике существует ряд способов реализации этого метода Николаус и сотр [396, 397] вводили в инокулированный агар хлорид трифенилтетразолия. Микроорганизмы восстанавливали хлорид трифенилтетразолия до трифенилформазана, имеющего яркую красновато-коричневую окраску. Однако в присутствии антибиотика восстановления

* Методы работы с радиоактивными индикаторами четко изложены в книге Лукьянов В. Б., Бердоносков С. С., Богатырев И. О., Заборенко К. В. Радиоактивные индикаторы в химии — М. Высшая школа, 1975 — *Прим ред*

не происходило, и в этих местах хроматограммы появлялись светло-желтые пятна, резко выделяющиеся на темном фоне. Гель, содержащий 0,7 мл 5 %-ного раствора хлорида трифенилтетразолия в 50 %-ном метаноле на 50 мл, осторожно наливали на поверхность подложки, помещенной в неглубокую пластиковую кювету. Охлажденную поверхность геля покрывали тонким слоем раствора стерильного агара, чтобы защитить гель от кислорода воздуха. После затвердевания защитного слоя пластинку выдерживали в холодильнике в закрытом контейнере в течение часа при 0°C с тем, чтобы антибиотик успел продиффундировать в агар. Далее пластинку помещали на 16 или более часов в термостат при 37°C, чтобы дать микроорганизмам размножиться. В зависимости от типа определяемого антибиотика для инокуляции применялись различные микроорганизмы. *Sarcina lutea* для рифомицина, *Staphylococcus aureus* для пенициллинов, *Bacillus subtilis* для пенициллинов и тетрациклинов. Бегу и Клайн [398] испробовали ряд солей тетразолия и нашли, что наилучшие результаты получаются при использовании ИНТ (*n*-иоднитротетразолиевый фиолетовый) или хлорида 2-*n*-иодфенил-3-*n*-нитрофенил-5-фенилтетразолия). Не все соли тетразолия при обнаружении того или иного антибиотика дают удовлетворительные результаты, поэтому наилучшую соль необходимо определять экспериментально.

Отбирая антибиотики с антиопухоловой активностью методом бумажной хроматографии, Шурменс и сотр. [399] вводили в агаровую среду реазуриновый краситель и клетки саркомы 180 и линии Detroit 6. По окончании двухдневного инкубационного периода в специальных условиях антиопухоловую активность препаратов оценивали по зоне ингибирования активности клеточной дегидрогеназы. Описанный метод должен быть пригоден также и в тонкослойном варианте. Перлмен и сотр. [400] при поисках антиопухоловых соединений вводили в среду агара клетки Игла типа KB, клетки Эрла типа L и клетки L-1210. Для получения биоавтограмм были использованы пластинки с тонким слоем агара.

Тот и Пиор [401] применили биологические методы для обнаружения и оценки свойств хлорированных инсектицидов. После проявления хроматограммы и испарения растворителя на пластинку накладывали решетку, содержащую 22 ячейки, покрывающую всю область расположения пятен разделенных соединений на пластинке. Для проверки инсектицидной активности разделенных соединений в каждую ячейку решетки помещали мух-дрозофил и покрывали сверху стеклом.

Бродаски [402] для обнаружения неомицинов использовал неглубокие кюветы с агаром, инокулированным микроорганизмом *Bacillus pumilus*. Чтобы антибиотик мог продиффундиро-

вать в агаровый гель, хроматограммы плотно прижимали к поверхности агара на 5—10 мин, после чего помещали в инкубатор и выдерживали 16 ч при 28°C. Бикель и сотр. [403] для осуществления диффузии антибиотика в агар помещали на инокулированный слой агара лист фильтровальной бумаги и прижимали к нему на 20 мин хроматографическую пластинку размером 20×20 см с усилием в 2 кг. Мейерс и Смит [404] описали несколько иной метод с применением хроматографии на свободном слое. Высушенную хроматограмму они покрывали влажной фильтровальной бумагой, на которую накладывали чистую стеклянную пластинку. Полученный «сэндвич» располагали таким образом, что хроматографическая пластинка оказывалась повернутой «лицом вниз», а края фильтровальной бумаги заворачивали вверх, на подложку. После этого стеклянную покрывную пластинку удаляли и покрытый бумагой слой прижимали к инокулированному микроорганизмами слою агара, чтобы обеспечить диффузию антибиотика.

Найдено, что при хроматографировании на полосках стеклоткани, пропитанной кремневой кислотой (Chrom AR фирмы Mallinckrodt), удается избежать прилипания частиц силикагеля к поверхности агара. Кроме того, в этом случае можно наносить на пластинку меньшую пробу, чем при работе с пластинками для биоавтографии [405].

Наришимхачари и Рамачандран [406] пользовались методом «липкой ленты» для переноса поверхностного слоя адсорбента с тонкослойной пластинки на пластинку с агаровой питательной средой. Контрольную пробу брали с поверхности чистой тонкослойной хроматографической пластинки. Ройсер [407] погружал проявленную и высушенную пластинку в раствор коллодия и затем высушивал ее в потоке воздуха. После этого слой коллодия вместе с адсорбентом снимали с пластинки и переносили на пластинку с агаром.

Клайн и Голеб [408] разработали простую и изящную методику обнаружения антибиотиков. Обработанную элюентом и высушенную хроматограмму опрыскивали раствором агара при температуре 100°C с помощью краскопульта фирмы Devilbis под давлением 1,9 кг/см². Полученный слой агара охлаждали и наливали на него слой инокулированной микроорганизмами агаровой питательной среды, охлажденной до 48°C. Таким образом удавалось обойтись без покрытия из фильтровальной бумаги и в то же время избежать расплывания пятен антибиотиков при налипании инокулированной питательной среды непосредственно на хроматографическую пластинку.

Хоумен и Фукс [409] для обнаружения фунгитоксичных соединений после соответствующей инкубации опрыскивали хроматографические пластинки непосредственно суспензией

Cladosporium cisterninum. При этом необходимо было следить, чтобы пластинки не смачивались чересчур обильно. Для обнаружения бактерицидных соединений в *Xanthomonas pruni*, которые не восстанавливают тетразолиевые красители, Гамильтон и Кук [410] вводили в питательную агаровую среду 0,4 % желатин. Поскольку *X. pruni* способен гидролизовать желатин (а также крахмал), слой заливали 10 %-ным раствором сульфата ртути(II) в 2,5 н. соляной кислоте. Негидролизованная желатина при этом образовывала белый осадок.

Мейерс и Эрикссон [411] нашли, что при прибавлении 0,1 % нитрата калия в качестве окислителя улучшается рост микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, используемых в качестве эталонных (колонию микроорганизмов покрывали стеклянной пластинкой).

Оно [412] проводил обнаружение витамина В₁₂ биоавтографическим методом. Он вводил микроорганизмы *Lactobacillus leichmannii* в агаровую среду, на которой хроматографировался витамин В₁₂.

Кройциг [413] использовал *Pediococcus cerevisiae* для обнаружения фолиевой кислоты в экстрактах мицелия плесневых грибов на пластинках с двойным слоем. Предел обнаружения достигал 50 пг.

Во всех этих методах, если элюирование проводится кислотами растворителями, хроматограмму следует обработать парами аммиака, чтобы нейтрализовать кислоту, которая замедляет рост микроорганизмов [396, 397].

Азалос и сотр. [414] опубликовали список эталонных микроорганизмов, пригодных для обнаружения многих антибиотиков, а Бетина — обзор по применению биоавтографии в тонкослойной и бумажной хроматографии [415].

ЛИТЕРАТУРА

1. Winterstein A., Hegedues B., *Chimia (Aarau)*, **14**, 18 (1960).
2. Winterstein A., Hegedues B., *Z. Physiol. Chem.*, **321**, 97 (1960).
3. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
4. Morris R. T., *Anal. Chem.*, **24**, 1528 (1952).
5. Naff M. B., Naff A. S., *J. Chem. Educ.*, **40**, 534 (1963).
6. Blatná J., Davídek J., *Experientia*, **17**, 474 (1961).
7. Davídek J., Blatná J., *J. Chromatogr.*, **7**, 204 (1962).
8. Janák J., *J. Chromatogr.*, **15**, 28 (1964).
9. Morris L. J., Holman R. T., Fontell K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 323 (1960).
10. Ахрем А. А., Кузнецова А. И., *Изв. АН СССР*, **138**, 591 (1961).
11. Privett O. S., Blank M. L., *J. Lipid Res.*, **2**, 37 (1961).
12. Bennett R. D., Heftmann E., *J. Chromatogr.*, **9**, 348 (1962).
13. Anderson R. H., Huntley T. E., Schwecke W. M., Nelson J. H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 349 (1963).

14. Abramson D., Blecher M., J. Lipid Res., 5, 628 (1964).
15. Berg A., Lam J., J. Chromatogr., 16, 157 (1964).
16. Lisboa B. P., Diczfalussy E., Acta Endocrinol., 40, 60 (1962).
17. Anthony W. L., Behr W. T., J. Chromatogr., 13, 567 (1964).
18. Smith L. L., Foell T., J. Chromatogr., 9, 339 (1962).
19. Matsumoto N., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 11, 1189 (1963); Chem. Abstr., 59, 15559 (1963).
20. Ehrhardt E., Cramer F., J. Chromatogr., 7, 405 (1962).
21. Privett O. S., Blank M. L., J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 520 (1962).
22. Ertel H., Horner L., J. Chromatogr., 7, 268 (1962).
23. Mangold H. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 708 (1961).
24. Barrett C. B., Dallas M. S., Padley F. B., J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 580 (1963).
25. Metz H., Naturwissenschaften, 48, 569 (1961).
26. Zimiński T., Borowski E., J. Chromatogr., 23, 480 (1966).
27. Walker B. L., J. Chromatogr., 56, 320 (1971).
28. Korolczuk J., Kwasmewska I., J. Chromatogr., 88, 428 (1974).
29. Jones D., Bowyer D. E., Gresham G. A., Howard A. N., J. Chromatogr., 24, 228 (1966).
30. Martin T. T., Allen M. C., J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 752 (1971).
31. Touchstone J. C., Murawec T., Kasparow M., Wortmann W., J. Chromatogr., Sci., 10, 490 (1972).
32. Touchstone J. C., Balin A. K., Murawec T., Kasparow M., J. Chromatogr., Sci., 8, 443 (1970).
33. Gaenshirt H., Malzacher A., Arch. Pharm., 293/65, 925 (1960).
34. Reichelt J., Pitra J., Collect. Czech. Chem. Commun., 27, 1709 (1962).
35. Anker L., Sonanini D., Pharm. Acta Helv., 37, 360 (1962).
36. Boyle P. H., Nelson P. H., Chem. Ind. (London), 1967, 1220.
37. Coigreave T., Lynes A., J. Chromatogr., 30, 117 (1967).
38. Szakasits J. J., Peurifoy P. V., Woods L. A., Anal. Chem., 42, 351 (1970).
39. Haati E., Jaakonmaki J., Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 47, 175 (1969).
40. Okumura T., Kadono T., Iso'o A., J. Chromatogr., 108, 329 (1975).
41. Gaenshirt H., Arch. Pharm., 296, 73 (1963).
42. Gritter R. J., Albers R. J., J. Chromatogr., 9, 392 (1962).
43. Tate M. E., Bishop C. T., Can. J. Chem., 40, 1043 (1962).
44. Heidbrink W., Fette, Seifen, Anstrichm., 66, 569 (1964).
45. Conway W. D., Piontek R. W., Shekosky J. M., J. Chromatogr., 27, 317 (1967).
- 45a. Smith B. R., J. Chromatogr., 82, 95 (1973).
- 45b. Segura R., Gotto A. M., Jr., J. Chromatogr., 99, 643 (1974).
- 45c. Shanfield H., Hsu F., Martin A. J. P., J. Chromatogr., 126, 457 (1976).
- 45d. Shanfield H., Lee K. Y., Martin A. J. P., J. Chromatogr., 142, 387 (1977).
46. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 26, 2002 (1954).
47. Sease J. W., J. Am. Chem. Soc., 69, 2242 (1947).
48. Ibid., 70, 3630 (1948).
49. Reitsem R. H., Anal. Chem., 26, 960 (1954).
50. Stahl E., Chem.-Ztg., 82, 323 (1958).
51. Machata G., Mikrochim. Acta, 1960, 79.
52. Černý V., Joska J., Lábler L., Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 1658 (1961).
53. Loomis W. D., private communication.
54. Seiler H., Rothweiler W., Helv. Chim. Acta, 44, 941 (1961).
55. Hammerschmidt H., Mueller M., Papier, 17, 448 (1963).
56. Daams J. H., J. Chromatogr., 10, 450 (1963).
57. Wieme R. J., Rabaey M., Naturwissenschaften, 44, 112 (1957).
58. Popadiuk L., Arch. Immunol. Ter. Dows, 9, 139 (1961).
59. Nuernberg E., Dtsch. Apoth.-Ztg., 101, 142 (1961).
60. Lisboa B. P., J. Chromatogr., 16, 136 (1964).
61. Prey V., Scherz H., Bancher E., Mikrochim. Acta, 1963, 567.
62. Adachi S., J. Chromatogr., 17, 295 (1965).
63. Somaroo B. H., Thakur M. L., Grant W. F., J. Chromatogr., 87, 290 (1973).
64. Martins P. M., Dick Y. P., J. Chromatogr., 32, 188 (1968).
65. Connors W. M., Boak W. K., J. Chromatogr., 16, 243 (1964).
66. Sattler L., Zerban F. W., Anal. Chem., 24, 1862 (1953).
67. Brockmann H., Spohler E., Waehnelde T., Chem. Ber., 96, 2925 (1963).
68. Knappe E., Peteri D., Rohdewald I., Z. Anal. Chem., 199, 270 (1963).
69. Goswami S. K., Frey C. H., J. Lipid Res., 12, 509 (1971).
70. Wagner H., Hoerhammer L., Wolff P., Biochem. Z., 334, 175 (1961).
71. Waring P. P., Ziporin Z. Z., J. Chromatogr., 15, 168 (1964).
72. Hanes C. S., Isherwood F. A., Nature, 164, 1107 (1949).
73. Stanley C. W., J. Chromatogr., 16, 467 (1964).
74. Baudler M., Stuhlmann F., Naturwissenschaften, 51, 57 (1964).
75. Barney J. E., II, J. Chromatogr., 20, 334 (1965).
76. Pilson M. E. Q., Fragala R. J., Anal. Chem. Acta, 52, 553 (1970).
77. Seiler H., Helv. Chim. Acta, 44, 1753 (1961).
78. Askew J., Ruzicka J. H., Wheals B. B., Analyst (London), 94, 275 (1969).
79. Fike W. W., Sunshine I., Anal. Chem., 37, 127 (1965).
80. Malaiyandi M., Barrette J. P., Lanquette M., J. Chromatogr., 101, 155 (1974).
81. Kowalczyk J., J. Chromatogr., 14, 411 (1964).
82. Бергельсон Л. Д., Дятловская Е. В., Воронкова В. В., ДАН СССР, 149, 1319 (1963).
83. Weicker H., Brossmer R., Klin. Wochenschr., 39, 1265 (1961).
84. Sjoeholm I., Svensk Farm. Tidskr., 66, 321 (1962).
85. Kritchevsky D., Martak D. S., Rothblat G. H., Anal. Biochem., 5, 388 (1963).
86. Johannesen B., Sandal A., Medd. Norsk Farm. Selsk., 23, 105 (1961).
87. Schweiger A., J. Chromatogr., 9, 374 (1962).
88. Van Gent C. M., Roseleur O. J., Van der Bijl P., J. Chromatogr., 85, 174 (1973).
89. Heřmáněk S., Schwarz V., Čekan Z., Collect. Czech. Chem. Commun., 26, 1669 (1961).
90. MacRae H. F., McKinley W. P., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 44, 207 (1961).
91. Korte F., Sieper H., J. Chromatogr., 13, 90 (1964).
92. Bancher E., Scherz H., Kaindl K., Mikrochim. Acta, 1964, 652.
93. Adamović V. M., J. Chromatogr., 23, 274 (1966).
94. Kottemann C. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 954 (1966).
95. Bischof M. D., Austin J. H., Biochim. Biophys. Acta, 70, 598 (1963).
96. Baur E. W., private communication.
97. Klenk E., Langerbeins H., Z. Physiol. Chem., 270, 185 (1941).
98. Boute J., Ann. Endocrinol. (Paris), 14, 518 (1953).
99. Klenk E., Gielen W., Z. Physiol. Chem., 333, 162 (1963).
100. Abbott D. C., Bunting J. A., Thompson J., Analyst (London), 90, 356 (1965).
101. Seiler H., Kaffenberger T., Helv. Chim. Acta, 44, 1282 (1961).
102. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 188, 184 (1962).
103. Thielemann H., Z. Anal. Chem., 272, 286 (1974).
104. Wade H. E., Morgan D. M., Nature, 171, 529 (1953).
105. Salamé M., J. Chromatogr., 16, 476 (1964).
106. Tadema G., Batelaan P. H., J. Chromatogr., 33, 460 (1968).
107. Goenechea S., J. Chromatogr., 40, 182 (1969).
108. Jatzkewitz H., Mehl E., Z. Physiol. Chem., 320, 251 (1960).
109. Killilea S. D., O'Carra P., J. Chromatogr., 54, 284 (1971).

110. Hayward L. D., Kitchen R. A., Livingstone D. J., Can. J. Chem., 40, 434 (1962).
111. Chrastil J., J. Chromatogr., 115, 273 (1975).
112. Gorman M., Neuss M., Biemann K., J. Am. Chem. Soc., 84, 1058 (1962).
113. Cone N. J., Miller R., Neuss N., J. Pharm. Sci., 52, 688 (1963).
114. Sundaram G. S., Sodhi H. S., J. Chromatogr., 61, 370 (1971).
115. Kump C., Schmid H., Helv. Chim. Acta, 45, 1090 (1962).
116. Sembdner G., Gross R., Schreiber K., Experientia, 18, 584 (1962).
117. Geiss F., Schlitt H., "Analyse von polyphenylgemischen mit der Dünnschichtchromatographie", Joint Research Center, Chemistry Department, Ispra Brussels, November 1961, 17 pages.
118. Schultz O. E., Strauss D., Arzneimittel-Forsch., 5, 342 (1955).
119. Seher A., Mikrochim. Acta, 1961, 308.
120. Pires L. M., Roseira A. N., J. Chromatogr., 56, 59 (1971).
121. Lindfors R., Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki), 41, 355 (1963).
122. Gaenshirt H., Arch. Pharm., 296, 73 (1963).
123. Rydon N. H., Smith P. W. G., Nature, 169, 922 (1952).
124. Zachau H. G., Karau W., Chem. Ber., 93, 1830 (1960).
125. Reindel F., Hoppe W., Chem. Ber., 87, 1103 (1954).
126. Pataki G., J. Chromatogr., 12, 541 (1963).
127. Brenner M., Niederwieser A., Pataki G., Experientia, 17, 145 (1961).
128. Thielemann H., Z. Chem., 13, 15 (1973).
129. Nuttall R. T., Bush I. E., Analyst (London), 96, 875 (1971).
130. Issaq H. J., Barr E. W., J. Chromatogr., 132, 121 (1977).
131. Stewart J. T., Sternson L. A., J. Chromatogr., 92, 182 (1974).
132. Tschesche R., Freytag W., Snatzke G., Chem. Ber., 92, 3053 (1959).
133. Gupta A. S., Dev S., J. Chromatogr., 12, 189 (1963).
134. Tschesche R., Freytag W., Snatzke G., Chem. Ber., 92, 3053 (1959).
135. Beroza M., J. Agric. Food Chem., 11, 51 (1963).
136. Gunner S. W., Hand T. B., J. Chromatogr., 37, 356 (1968).
137. Heacock R. A., Mahon M. E., Can. J. Biochem. Physiol., 41, 487 (1963).
138. Bischel M. D., Austin J. H., Biochim. Biophys. Acta, 70, 598 (1963).
139. Donner R., Lohs Kh., J. Chromatogr., 17, 349 (1965).
140. Aharoni S. M., Litt M. H., Anal. Chem., 42, 1467 (1970).
141. Geldmacher-Mallinckrodt M., Weigel U., Arch. Toxikol., 20, 114 (1963).
142. Hashmi M. H., Shahid M. A., Ayaz A. A., Chughtai F. R., Hassan N., Anal. Chem., 38, 1554 (1966).
143. Merkus F. W. H. M., "Progress in Inorganic Thin-Layer Chromatography", in Progress in Separation and Purification, Vol. 3, E. S. Perry and C. J. Van Oss, Eds., Wiley-Interscience, 1970, p. 234.
144. Kaufmann H. P., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 64, 81 (1962).
145. Kaufmann H. P., Makus Z., Khoe T. H., Fette, Seifen, Anstrichm., 63, 689 (1961).
146. Campaigne E., Georgiadis M., J. Org. Chem., 28, 1044 (1963).
147. Hranisavljević-Jakovljević M., Pejković-Tadić I., Stojiljković A., J. Chromatogr., 12, 70 (1963).
148. Geldmacher-Mallinckrodt M., Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med., 54, 90 (1963).
149. Guben K. C., Cobanlar S., Eczacilik Bull., 9, 98 (1967).
150. Weidemann G., Fischer W., Z. Physiol. Chem., 336, 189 (1964).
151. Jones G. R. N., J. Chromatogr., 77, 357 (1973).
152. Stenerson J., J. Chromatogr., 54, 77 (1971).
153. Ross J. H., Anal. Chem., 40, 2138 (1968).
154. Fishbein L., Fawkes J., J. Chromatogr., 22, 323 (1966).
155. Frei R. W., Belliveau P. E., Chromatographia, 5, 296 (1972).
156. Roy S., Chakraborty D. P., J. Chromatogr., 96, 266 (1974).
157. Mangold H. K., Malins D. C., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 383 (1960).
158. Franc J., Hájková M., Jehlicka M., Chem. Zvesti., 17, 542 (1963).

159. Passera C., Pedrotti A., Ferrari G., J. Chromatogr., 14, 289 (1964).
160. Boehme H., Kreutzig L., Apoth.-Ztg., 103, 505 (1963).
161. Gaenshirt H., Malzacher A., Naturwissenschaften, 47, 279 (1960).
162. Klouwen M. H., ter Heide R., Parluem. Kosmet., 43, 195 (1962).
163. Seher A., Fette, Seifen, Anstrichm., 61, 345 (1959).
164. Copius-Peerboom J. W., J. Chromatogr., 4, 323 (1960).
165. Schulte K. E., Ahrens F., Sprenger E., Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg., 108, 1165 (1963).
166. Forrest J. E., Richard R., Heacock R. A., J. Chromatogr., 65, 439 (1972).
167. Yasuda S. K., J. Chromatogr., 13, 78 (1964).
168. Ibid., 14, 65 (1964).
169. Nuernberg E., Arch. Pharm., 292/64, 610 (1959).
170. Dal Cortiva L. A., Broich J. R., Dührberg A., Newman B., Anal. Chem., 38, 1959 (1966).
171. Agurell S., Ramstad E., Lloydia, 25, 67 (1962).
172. Osborne B. G., J. Chromatogr., 70, 190 (1972).
173. Perhavec J., Perpar M., Mikrochim. Acta, 1964, 1029.
174. Henkel H. G., Chimia (Aarau), 18, 252 (1964).
175. Spengler D., Jumar A., J. Chromatogr., 49, 329 (1970).
176. Karpitschka N., Mikrochim. Acta, 1963, 157.
177. Meinhard J. E., Hall N. F., Anal. Chem., 21, 185 (1949).
178. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 190, 386 (1962).
179. Baeumler J., Rippstein S., Helv. Chim. Acta, 44, 1162 (1961).
180. Ibid., Arch. Pharm., 296, 301 (1963).
181. Stárka L., Hampl R., J. Chromatogr., 12, 347 (1963).
182. Lisboa B. P., J. Chromatogr., 13, 391 (1964).
183. Grasshof H., J. Chromatogr., 14, 513 (1964).
184. Honegger C. G., Helv. Chim. Acta, 45, 281 (1962).
185. Hansson J., Explosivstoffe, 10, 73 (1963).
186. Preussmann R., Daiber D., Hengy H., Nature, 201, 502 (1964).
187. Katz D., J. Chromatogr., 15, 269 (1964).
188. Faucheux L. J., Jr., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 955 (1965).
189. New R., Naturwissenschaften, 44, 181 (1957).
190. Pfunder B., Zurflueh R., Seiler H., Erlenmeyer H., Helv. Chim. Acta, 45, 1153 (1962).
191. Mangold H. K., Kammereck R., Chem. Ind (London), 1961, 1032.
192. Lehmann J., Karamustafaoglu U., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 14, 554 (1962).
193. Tuerler M., Hoegl D., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 52, 132 (1961).
194. Bergstroem G., Lagercrantz C., Acta Chem. Scand., 18, 560 (1964).
195. Stevens P. J., J. Chromatogr., 14, 269 (1964).
196. Dilley R. A., Anal. Biochem., 7, 240 (1964).
197. Braekkan O. R., Lambertsen G., Myklestad H., Fiskeridir. Skr. Ser. Teknol. Unders., 4, 3 (1963).
198. Seiler H., Helv. Chim. Acta, 46, 2629 (1963).
199. Kuenzi P., dissertation, Basel University, 1962.
200. Geike F., Schuphan I., J. Chromatogr., 72, 153 (1972).
201. Thies H., Reuther F. W., Naturwissenschaften, 41, 230 (1954).
202. Vágúfalvi D., Planta Med., 8, 34 (1960).
203. Tyihák J., Chromatogr., 14, 125 (1964).
204. Munier R., Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 1225 (1953).
205. Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Dtsch. Apoth.-Ztg., 100, 477 (1960).
206. Feltkamp H., Koch F., J. Chromatogr., 15, 314 (1964).
207. Thoma K., Rombach R., Ullmann E., Arch. Pharm., 298, 19 (1965).
208. Buerger K., Z. Anal. Chem., 196, 259 (1963).
209. Korte F., Vogel J., J. Chromatogr., 9, 381 (1962).

210. *Lepage M.*, *J. Chromatogr.*, **13**, 99 (1964).
 211. *Baker P. B., Farrow J. E., Hoodless R. A. H.*, *J. Chromatogr.*, **81** 174 (1973).
 212. *Mendoza C. E., Grant D. L., Braceland B., McCully K. A.*, *Analyst (London)*, **1969**, 805.
 213. *Cassidy J. E., Ryskiewich D. P., Murphy R. T.*, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 558 (1969).
 214. *Segura-Cardona R., Soehring K.*, *Med. Exp.*, **10**, 251 (1964).
 215. *Pastuska G.*, *Z. Anal. Chem.*, **179**, 355 (1961).
 216. *Hoerhammer L., Wagner H., Bittner G.*, *Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg.*, **108**, 259 (1963).
 217. *Knappe E., Peteri D., Rohdewald I.*, *Z. Anal. Chem.*, **197**, 364 (1963).
 218. *Cochin J., Daly J. W.*, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **139**, 160 (1963).
 219. *Sen B. N.*, *Anal. Chim. Acta*, **23**, 152 (1960).
 220. *Knappe E., Yekundi K. G.*, *Z. Anal. Chem.*, **203**, 87 (1964).
 221. *Noirfalise A., Grosjean M. H.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 236 (1964).
 222. *Gillio-Tox M., Previtera S. A., Vimercati A.*, *J. Chromatogr.*, **13**, 571 (1964).
 223. *Eble J. N., Brooker R. M.*, *Experientia*, **18**, 524 (1962).
 224. *Patterson S. J., Clements R. L.*, *Analyst (London)*, **89**, 328 (1964).
 225. *Hammonds T. W., Shone G.*, *J. Chromatogr.*, **15**, 200 (1964).
 226. *Skidmore W. D., Entenman C.*, *J. Lipid Res.*, **3**, 471 (1962).
 227. *Maruyama K., Onoe K., Goto R.*, *Nippon Kagaku Zasshi*, **77**, 1496 (1956); *through Chem. Abstr.*, **52**, 2665 (1958).
 228. *Sherma J., Marzoni G.*, *Am. Lab.*, **6**, 21 (1974).
 229. *Young J. C.*, *J. Chromatogr.*, **130**, 392 (1977).
 230. *Ranieri R. L., McLaughlin J. L.*, *J. Chromatogr.*, **111**, 234 (1975).
 231. *Rinde E., Troll W.*, *Anal. Chem.*, **48**, 542 (1976).
 232. *Folin O., Ciocalteu V.*, *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1929).
 233. *Fiala E. S., Weisburger J. H.*, *J. Chromatogr.*, **105**, 189 (1975).
 234. *Keith R. W., Le Tourneau D., Mahlum D.*, *J. Chromatogr.*, **1**, 534 (1958).
 235. *Procházka Z.*, *Chem. Listy*, **47**, 1637 (1953).
 236. *Stahl E., Kaldewey H.*, *Z. Physiol. Chem.*, **323**, 182 (1961).
 237. *Awe W., Schultz W.*, *Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg.*, **107**, 1333 (1962).
 238. *Kucharczyk N., Fohl J., Vymetal J.*, *J. Chromatogr.*, **11**, 55 (1963).
 239. *Mueller K. H., Honerlagen H.*, *Arch. Pharm.* **293/65**, 202 (1960).
 240. *Rollins C. B., Wood R. D.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 555 (1964).
 241. *Micheel F., Schweppe H.*, *Mikrochim. Acta*, **1954**, 53.
 242. *Klouwen M. H., ter Heide R., Kok J. G. J.*, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **65**, 414 (1963).
 243. *Sundt E., Saccardi A.*, *Food Tech.*, **16**, 89 (1962).
 244. *Stanley W. L.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **44**, 546 (1961).
 245. *Topham J. C., Westrop J. W.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 233 (1964).
 246. *Sen B. N.*, *Anal. Chim. Acta*, **12**, 154 (1955).
 247. *Markl P., Hecht F.*, *Mikrochim. Acta*, **1963**, 889.
 248. *Seiler H., Seiler M.*, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 939 (1961).
 249. *Seiler H., Seiler M.*, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1939 (1960).
 250. *Adam G., Schreiber K.*, *Z. Chem.*, **3**, 100 (1963).
 251. *Cherbuliez E., Baehler B., Rabinowitz J.*, *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1350 (1964).
 252. *Ibid.*, **43**, 1871 (1960).
 253. *Fischer R., Lautner H.*, *Arch. Pharm.*, **294/66**, 1 (1961).
 254. *Fischer R., Klingelhoeller W.*, *Pflanzenschutz Ber.*, **27**, 165 (1961).
 255. *Schreiber K., Aurich O., Osske G.*, *J. Chromatogr.*, **12**, 63 (1963).
 256. *McAleer W. J., Kozlowski M. A.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**, 125 (1957).
 257. *Hashmi M. H., Chughtai F. R., Adil A. S., Qureshi T.*, *Mikrochim. Acta*, **1967**, 1111.

258. *Pokorny M., Vitezić N., Japelj M.*, *J. Chromatogr.*, **77**, 458 (1973).
 259. *Curtis R. F., Phillips G. T.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 366 (1962).
 260. *Heathcote J. G., Haworth C.*, *J. Chromatogr.*, **43**, 84 (1969).
 261. *Barrollier J., Heilman J., Watzke E.*, *Z. Physiol. Chem.*, **304**, 21 (1956).
 262. *von Arx E., Neher R.*, *J. Chromatogr.*, **12**, 329 (1963).
 263. *Vaedtke J., Gajewska A.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 345 (1962).
 264. *Goerlich B.*, *Planta Medica*, **9**, 442 (1961).
 265. *Hoerhammer L., Wagner H., Koenig H.*, *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **103**, 502 (1963).
 266. *Hoerhammer L., Wagner H., Hein K.*, *J. Chromatogr.*, **13**, 235 (1964).
 267. *Wasserman L., Hanus H.*, *Naturwissenschaften*, **50**, 351 (1963).
 268. *Blinn R. C., Gunther F. A.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chemists*, **46** 204 (1963).
 269. *Goswami S. K., Frey C. F.*, *J. Chromatogr.*, **53**, 389 (1970).
 270. *Umberger C. J.*, *J. Chromatogr.*, **60**, 95 (1971).
 271. *Stroh H. H., Schueler W.*, *Z. Chem.*, **4**, 188 (1964).
 272. *Crépy O., Judas O., Lachese B.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 340 (1964).
 273. *Zinzadze C.*, *Ind. Eng. Chem.*, **7**, 227 (1935).
 274. *Dittmer J. C., Lester R. L.*, *J. Lipid Res.*, **5**, 126 (1964).
 275. *Schellenberg P.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1**, 114 (1962).
 276. *Morris C. J. O. R.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 167 (1964).
 277. *Groulade J., Fine J. N., Olliver C.*, *Nature*, **191**, 72 (1961).
 278. *Prey V., Berbalk H., Kausz M.*, *Mikrochim. Acta*, **1961**, 968.
 279. *Richter E.*, *J. Chromatogr.*, **18**, 164 (1965).
 280. *Dhont J. H., de Rooy C.*, *Analyst (London)*, **86**, 527 (1961).
 281. *Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H.*, *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **100**, 283 (1960).
 282. *Klein S., Kho B. T.*, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 966 (1962).
 283. *Heathcote J. G., Washington R. J., Keogh B. J.*, *J. Chromatogr.*, **104**, 141 (1975).
 284. *Morris L. J., Holman R. T., Fontell K.*, *J. Lipid Res.*, **1**, 412 (1960).
 285. *Moffat E. D., Lytle R. I.*, *Anal. Chem.*, **31**, 926 (1959).
 286. *Brenner M., Niederwieser A.*, *Experientia*, **16**, 378 (1960).
 287. *Anet E. F. L. J.*, *J. Chromatogr.*, **63**, 465 (1971).
 288. *Baeumler J., Luedin M.*, *Arch. Toxikol.*, **20**, 96 (1963).
 289. *Sapira J. D.*, *J. Chromatogr.*, **42**, 136 (1969).
 290. *Schulz M., Seeboth H., Wieker W.*, *Z. Chem.*, **2**, 279 (1962).
 291. *Chiba M., Morley H. V.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **47**, 667 (1964).
 292. *Roser R., Tocci P. M.*, *J. Chromatogr.*, **72**, 207 (1972).
 293. *Finocchiaro J. M., Benson W. R.*, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**, 888 (1967).
 294. *Pomonis J. G., Severson R. F., Freeman P. J.*, *J. Chromatogr.*, **40**, 78 (1969).
 295. *Watts R. R.*, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **48**, 1161 (1965).
 296. *Ratney R. S.*, *J. Chromatogr.*, **11**, 111 (1963).
 297. *Schulie K. E., Ruecker G.*, *J. Chromatogr.*, **49**, 317 (1970).
 298. *Zoellner N., Wolfram G.*, *Klin. Wochenschr.*, **40**, 1100 (1962).
 299. *Ognyanov I.*, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, **16**, 161 (1963).
 300. *Cassidy R. M., Miketukova V., Frei R. W.*, *Anal. Lett.*, **5**, 115 (1972).
 301. *Baeumler J., Rippstein S.*, *Pharm. Acta Helv.*, **36**, 382 (1961).
 302. *Petschik H., Steger E.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 307 (1962).
 303. *Stephenson N. R.*, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 391 (1959).
 304. *Meyer H.*, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **57**, 170 (1961).
 305. *Lindeberg E. G. G.*, *J. Chromatogr.*, **117**, 439 (1976).
 306. *Choulis N. H.*, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 904m (1967).
 307. *Mehlitz A., Gierschner K., Minas T.*, *Chem.-Ztg.*, **87**, 573 (1963).
 308. *Jaminet F.*, *Farmaco Ed. Prat.*, **18**, 633 (1963).
 309. *Furukawa T.*, *Nippon Kagaku Zasshi*, **78**, 1185 (1957); *Chem. Abstr.*, **52**, 13364 (1958).

- 310 Greig C G, Leaback D H, Nature, 188, 310 (1960)
 311 Stahl E Arch Pharm, 293/65, 531 (1960)
 312 Baker P B, Farrow J E, Hoodless R A, J Chromatogr, 81, 174 (1973)
 313 Huang J-T, Hsu H-C, Wang K-T, J Chromatogr, 29, 391 (1967)
 314 Akita E, Ikekawa T, J Chromatogr, 2, 250 (1963)
 315 Johri K N, Kaushik N K, Ind J Appl Chem, 33, 173 (1970)
 316 Eastwood M A, Hamilton D, Biochem J, 105, 37c (1967)
 317 Buerger K, Z Anal Chem, 192, 280 (1962)
 318 Johri K N, Mehra H C, Mikrochim Acta, 1971, 317
 319 David S, Hurshfeld H, Bull Soc Chim Fr, 1963, 1011
 320 Copius-Peerboom J W, Beekes H W, J Chromatogr, 14, 417 (1964)
 321 Mule S J, J Chromatogr, 39, 302 (1969)
 322 Cadenas R, Deferrari J O, Analyst (London), 86, 132 (1961)
 323 Deferrari J O, de Lederkremer R M, Matsuhuro B, Sproviero J F, J Chromatogr, 9, 283 (1962)
 324 Abbott D C, Egan H, Hammond E W, Thomson J, Analyst (London), 89, 480 (1964)
 325 Бергельсон Л Д, Дятловицкая Э В, Воронкова В В, Изв ДАН СССР, 141, № 1, 84 (1961)
 326 Seiler H, Erlennmeyer H, Helv Chim Acta, 47, 264 (1964)
 327 Bate-Smith E C, Westall R G, Biochim Biophys Acta, 4, 427 (1950)
 328 Wallington E A, J Med Lab Tech, 22, 220 (1965)
 329 Henkel H G, Ebing W, J Chromatogr, 14, 283 (1964)
 330 Petzold J A, Camp W, Jr, Kirch E R, J Pharm Sci, 52, 1106 (1963)
 331 Abbott D C, Egan H, Thomson J, J Chromatogr, 16, 481 (1964)
 332 Tripathi R K, Bhaktavatsalam G, J Chromatogr, 87, 283 (1973)
 333 Salo T, Salminen K, Fiskari K, Z Lebensm Untersuch Forsch, 117, 369 (1962)
 334 Kovacs M F, Jr, J Assoc Off Agric Chem, 46, 884 (1963)
 335 Ibid, 48, 1018 (1965)
 336 Anet E F L J, J Chromatogr, 9, 291 (1962)
 337 Vaskovsky V E, Svetashev V I, J Chromatogr, 65, 451 (1972)
 338 Maes R, Gijbels M, Lauruelle L, J Chromatogr, 53, 408 (1970)
 339 Bican-Fister T, Kajganovic V, J Chromatogr, 11, 492 (1963)
 340 Baeumler J, Ripstein S, Helv Chim Acta, 44, 2208 (1961)
 341 Peyre J P, Reynier M, Ann Pharm Fr, 27, 749 (1969)
 342 Kloubek J, Marhoul A, Collect Czech Chem Commun, 28, 1016 (1963)
 343 Katayama T, Ikeda H, Sci Pap Inst Phys Chem Res, Tokyo, 60, 85 (1960)
 344 Neidlein R, Kruell H, Meyl M, Dtsch Apoth Ztg, 105, 481 (1965)
 345 Stephan R, Erdman J G, Nature, 203, 749 (1964)
 346 Waldi D, J Chromatogr, 18, 417 (1965)
 347 Baddiley J, Buchanan J, Handschumacher R E, Prescott J F, J Chem Soc, 1956, 2818
 348 Matlocks A R, J Chromatogr, 27, 505 (1967)
 349 Bharia I S, Singh J, Bajaj K L, J Chromatogr, 79, 350 (1973)
 350 Vamos J, Bratner A, Szaz G, Vegh A, Acta Pharm Hung, 38, 378 (1968)
 351 Ibid, 40, 135 (1970)
 352 Furukawa T, Nippon Kagaku Zasshi, 78, 1185 (1957), through Chem Abstr, 52, 13364 (1958)
 353 Kohli J C, J Chromatogr, 121, 116 (1976)
 354 Wagner G, Pharmazie, 10, 302 (1955)
 355 Haas H J, Seeliger A, J Chromatogr, 13, 573 (1964)
 356 Olive B M, J Assoc Off Anal Chem, 56, 915 (1973)
 357 Kovacs M F, Jr, J Assoc Off Agric Chem, 47, 1097 (1964)
 358 Geiss F, Schlitt H, Ritter F J, Weimar W M, J Chromatogr, 12, 469 (1963)
 359 Fushbein L, J Chromatogr, 24, 245 (1966)
 360 Fishbein L, Fawkes J, J Chromatogr, 22, 323 (1966)
 361 Druding L F, Anal Chem, 35, 1582 (1963)
 362 Adamec O, Matis J, Galvanek M, Steroids, 1, 495 (1963)
 363 McCarthy J L, Brodsky A L, Mitchell J A, Herrscher R F, Anal Biochem, 8, 164 (1964)
 364 Frei R W, Mketukova V, Mikrochim Acta, 1971, 290
 365 Nisbet M A, Analyst (London), 1969, 811
 366 Kawashiro I, Hosogai Y, Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 5, 54 (1964), Chem Abstr, 61, 6262 (1964)
 367 van Arkel C, Ballieux R E, Jordan F L J, J Chromatogr, 11, 421 (1963)
 368. Battiale J, Dunning R L, Loomis W D, Biochim Biophys Acta, 51, 538 (1961)
 369. Lukas G, Sci Pharm, 30, 47 (1962)
 370 Jensen K B, Acta Pharmacol Toxicol, 9, 99 (1953)
 371 Duncan G R, J Chromatogr, 8, 37 (1962)
 372 Vinson J A, Hooyman J E, J Chromatogr, 105, 415 (1975)
 373 Munier R L, Peigner A, Thommegay C, Chromatogr, 3, 205 (1970)
 374 Gower D B, J Chromatogr, 14, 424 (1964)
 375 Ranny M, Veda Vyzk Prum Potravin, 18, 191 (1968), through Chem Abstr, 72, 62550z (1970)
 376 Sander H, Naturwissenschaften, 48, 303 (1961)
 377 Wright M E, Satchell D G, J Chromatogr, 55, 413 (1971)
 378 Matthews J S, Biochim Biophys Acta, 69, 163 (1963)
 379 Ito M, Wakamatsu S, Kawahara H, J Chem Soc Japan, Pure Chem Sect, 75, 413 (1954), Chem Abstr, 48, 13172 (1954)
 380 Finocchiaro J M, Benson W R, J Assoc Off Anal Chem, 50, 888 (1967)
 381 Merkus F W H M, "Progress in Inorganic Thin-Layer Chromatography", in Progress in Separation and Purification, Vol 3, E S Perry and C J Van Oss, Eds, Wiley Interscience, 1970, 234
 382 Neher R "Thin Layer Chromatography of Steroids", in Thin Layer Chromatography, G B Marini Bettolo, Ed, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 75
 383 Dose K, Krause G, Naturwissenschaften, 49, 349 (1962)
 384 Dobiasova M, J Lipid Res, 4, 481 (1963)
 385 Reitsem R H, Cramer F J, Scully N J, Chorney W J Pharm Sci, 50, 18 (1961)
 386 Sheppard H, Tsien W H, Anal Chem, 35, 1992 (1963)
 387 Schwane R A, Nakon R S, Anal Chem, 37, 315 (1965)
 388 Tio C O, Sisenwine S F, J Chromatogr, 48, 555 (1970)
 389 Prescott K M, David G S, Anal Biochem, 57, 232 (1974)
 390 Breccia A, Spalletti F, Nature, 198, 756 (1963)
 391 Massaglia A, Rosa U, J Chromatogr, 14, 516 (1964)
 392 Rosenberg J, Bolgar M, Anal Chem, 35, 1559 (1963)
 393 Karlson P, Maurer R, Wenzel M, Z Naturforsch, 18, 219 (1963)
 394 Schulze P E, Wenzel M, Angew Chem Int Ed Engl, 1, 580 (1962)
 395 Borke M L, Kirch E R, J Am Pharm Assoc Sci Ed, 42, 627 (1953)
 396 Nicolaus B J R, Coronelli C, Binaghi A, Farmaco Ed Prat, 16, 349 (1961), Chem Abstr, 56, 7428 (1962)
 397 Ibid, Experimentia, 17, 473 (1961)
 398 Begue W J, Kline R M, J Chromatogr, 64, 182 (1972)
 399 Schuurmans D M, Duncan D T, Olson B H, Cancer Res, 24, 83 (1964)
 400 Perlman D, Lumms W L, Geiersbach H J, J Pharm Sci, 58, 633 (1969)

401. *Tóth L., Piórr W.*, Z.-Lebensm.-Forsch, 133, 322 (1967).
 402. *Brodasky T. F.*, Anal. Chem., 35, 343 (1963).
 403. *Bickel H., Gaeumann E., Huetter R., Sackmann W., Vischer E., Voser W., Wettstein A., Zaehner H.*, Helv. Chim. Acta, 45, 1396 (1962).
 404. *Meyers E., Smith D. A.*, J. Chromatogr., 14, 129 (1964).
 405. *Wagman G. H., Bailey J. V.*, J. Chromatogr., 41, 263 (1969).
 406. *Narasimhachari N., Ramachandran S.*, J. Chromatogr., 27, 494 (1967).
 407. *Reusser P.*, Z. Anal. Chem., 231, 345 (1967).
 408. *Kline R. M., Golab T.*, J. Chromatogr., 18, 409 (1965).
 409. *Homans A. L., Fuchs A.*, J. Chromatogr., 51, 327 (1970).
 410. *Hamilton P. B., Cook C. E.*, J. Chromatogr., 35, 295 (1968).
 411. *Meyers E., Erickson R. C.*, J. Chromatogr., 26, 531 (1967).
 412. *Ono T., Kawasaki M.*, Vitamin, 30, 280 (1964); through Chem. Abstr., 62, 1957 (1965).
 413. *Kreuzig F.*, Z. Anal. Chem., 255, 126 (1971).
 414. *Aszalos A., Davis S., Frost D.*, J. Chromatogr., 37, 487 (1968).
 415. *Betina V.*, J. Chromatogr., 78, 41 (1973).

Глава VIII

ДОКУМЕНТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. КАЛЬКИРОВАНИЕ ПЯТЕН
ИЛИ СОХРАНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО СЛОЯ

Существует несколько способов документирования и сохранения результатов ТСХ. На пластинку накладывают кальку и обводят все пятна [1]; иногда в этих целях пользуются ацетатными пленками [2, 3]. В последнем случае для каждой группы пятен применяют отдельные полоски пленки, а затем, собрав их вместе, получают общую картину. Хроматограммы можно переносить и на прозрачные полиэтиленовые пленки (толщина 0,00382 мм; фирма Crystal X Corporation), пропускающие УФ-лучи [4]. Желательно подкладывать под бумагу или пленку стеклянную пластинку и использовать специальный фонарь, помогающий видеть пятна [5]. Найбом [6] разработал код для обозначения цвета пятен при калькировании.

Один из первых и наиболее простых методов [7] сохранения хроматограмм состоит в следующем. На пластинку накладывают полоску липкой ленты (Scotch tape) так, чтобы ее концы выступали за края пластинки. Энергично потирая обратную сторону ленты каким-либо гладким предметом, добиваются тесного контакта ее липкой поверхности с хроматографическим слоем. При снятии ленты на ней остается прочно прилипшая верхняя часть слоя. Выступающими концами ленту фиксируют на карточке.

Мотье и Поттера [8], работая с незакрепленными слоями оксида алюминия, после обнаружения пятен заливали пластинку расплавленным парафином. Барролье [9] заливал хроматограмму 4 %-ным раствором коллодия, содержащим 7,5 % глицерина. После испарения растворителя образовавшуюся пленку легко отделить от пластинки. Позднее было предложено фиксировать хроматограммы, распыляя по их поверхности суспензию полимера [10—12]. Лихтенбергер [12] обнаружил, что, распыляя 15 %-ный водный раствор поливинилиденхлорида, можно получить весьма прочную, но желтоватую пленку. Поливинилпропионат, напротив, дает механически менее прочную, но чисто белую пленку. В настоящее время в продаже имеется ряд полимерных аэрозольных препаратов для покрытия тонкослойных хроматограмм. Пользуясь такими аэрозолями, наносят очень тонкое покрытие, которое высушивают, предотвращая

растекание пятен. Затем слой вновь опрыскивают для насыщения адсорбента. После высушивания на верхнюю поверхность накладывают отрезок бесцветной прозрачной ленты. Слой полимера вдоль края пластинки окунают в воду, чтобы уменьшить прочность его прилипания. После такой обработки слой легко снимается с поверхности носителя. При наличии водорастворимых соединений погружать пластинку в воду не следует. Поскольку нижняя поверхность слоя все еще содержит незакрепленные частицы, слой можно перевернуть и покрыть для фиксации тонким слоем полимера.

Хотя это и несколько громоздко, тонкослойную пластинку можно сохранить, наложив поверх слоя другую стеклянную пластинку и соединив края пластинок лентой [13, 14]. Таким способом удобнее фиксировать не стеклянные, а пластмассовые пластинки, поскольку последние можно покрыть другой пластмассовой пластинкой и вклеить непосредственно в блокнот.

2. ФОТОГРАФИРОВАНИЕ И ДРУГИЕ МЕТОДЫ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ

Тонкослойные пластинки можно, конечно, фотографировать как на черно-белую, так и на цветную пленку. Браун и Бенжамин [15] фотографировали пластинки и в отраженном и в проходящем свете, поскольку при такой методике лучше видны микропримеси. В работе [16] подробно описано фотографирование пятен порфирина на черно-белую и цветную пленки. Другие исследователи [17—20, 23] получали цветные фотографии флуоресцирующих веществ, испускающих УФ-излучение. Для этих работ особенно удобна камера Polaroid [21—23], так как при этом результаты видны непосредственно, а хроматограмма остается пригодной для дальнейших фотографических работ. Хайнц и Витек [23] обсудили и проиллюстрировали возможность применения фильтров с камерой Polaroid для усиления контрастности при фотографировании и для получения соответствующих отпечатков пятен различного типа на хроматограммах. Джексон [24] подробно описал метод регистрации поглощения коротковолнового УФ-излучения пятнами на ТСХ при использовании камеры с узкодифракционным коллиматором.

Штатив Reprostar для камеры, выпускаемый фирмой SAMAG, позволяет фотографировать и в УФ-свете и в видимом свете.

Автордиограммы радиоактивных соединений можно получить, поместив пленку непосредственно на тонкий слой сорбента (рис. 8.1). В этих целях используют медицинскую рентгеновскую пленку фирмы Kodak No-Screen Medical X-ray Film. Экспозиции при этом могут, конечно, меняться в широком диапа-

зоне: от 1 ч при высоком уровне радиоактивности до 9 сут при более низкой радиоактивности [25].

Ричардсон и др. [26] на одной и той же хроматограмме дифференцировали ^{14}C и ^3H , поместив целлофановый экран ($3,35 \text{ мг/см}^2$) между пленкой и тонким слоем. Такой экран поглощал практически всю радиоактивность трития и пропускал

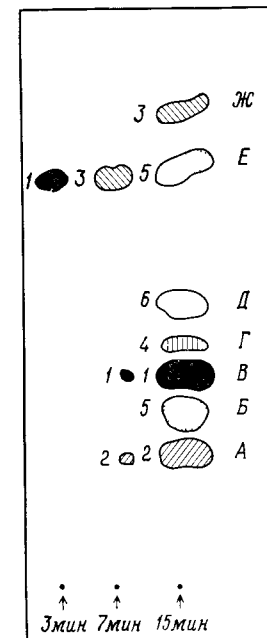


Рис. 8.1. Рисунок, изображающий радиоавтограф хроматограммы масел, полученных из растений мяты, экспонированных в атмосфере $^{14}\text{CO}_2$ в течение 3, 7 и 15 мин. Хотя пятна вполне отчетливы, контрастность их недостаточна для репродукции [25] (с разрешения авторов и Am. Pharm. Assoc.).

A — неидентифицированное пятно с R_f 0,23, B — ментол; B — пиперитон; Г — пулегон, Д — ментон, E — неидентифицированное пятно с R_f 0,77, Ж — углеводы. Числа 1—6 показывают относительную интенсивность пятен, которая уменьшается с ростом числа.

50 % радиоактивности ^{14}C . Для своих фотографических пластинок Шеппард и Тсиен [27] использовали эмульсию типа NTB, применяемую для обнаружения треков ядерных частиц. Эти авторы описали методику нанесения такой эмульсии на стеклянные пластинки.

С тонкослойных хроматограмм можно непосредственно получить различные отпечатки. Можно использовать копирующие машины типа Xerox 914 Office Copier [28]. Фелиси и др. [29] показали, что наилучшие результаты дает копирующая машина фирмы Xerox, модель 422. Для копирования применяют также диазобумагу [30—32]. В этом случае на тонкослойную пластинку помещают сначала лист целлофана, далее лист диазобумаги и затем стеклянную пластинку. После экспонирования на свету диазотпечатки проявляют, выдерживая в парах аммиака. Целлофановые листы необходимы при любом методе

копирования, если реактив, напыленный на пластинку, может взаимодействовать со средой [33]. Для получения контактных отпечатков сквозь стеклянные пластинки носителя флуоресцирующих веществ, поглощающих ультрафиолетовое излучение, Мак-Свини [34] использовал бромистую фотобумагу. Такие снимки были получены для слоев целлюлозы (DEAE или PEI). Пальморк [35] повышал чувствительность фотобумаги (Kodak Bromide WSG. 3S) к УФ-излучению, выдерживая ее не менее 2 мин в 1 %-ном растворе лимонной кислоты в этаноле [36]. Перед получением фотоотпечатка Гэфендел [37] превращал слои в прозрачные, опрыскивая их смесью равных частей парафина и эфира. Хассур и Уайтлок [38] использовали пленку Kodak SWR (коротковолновое излучение) либо мелкозернистую позитивную пленку 5302 и 7302 для непосредственного контактного фотовоспроизведения неокрашенных полос нуклеиновой кислоты в гелях полиакриламида. При проведении количественного определения полученные отпечатки можно сканировать. Поскольку пятна слабо поглощают в УФ-области, их целесообразно предварительно окрасить красителем «ярко-синий Comasie». Шпренгер [39] получал копии хроматограмм на бумаге, покрытой окисью цинка, которую можно зарядить электростатически. Сначала такую бумагу заряжают в темном помещении, затем на нее помещают окончательно обработанную хроматограмму и в течение короткого времени освещают соответствующим источником света. После этого бумагу опыляют окрашенным позитивным порошком (Philip A. Hunt Co.), который прилипает только в тех местах, где сохранился заряд, причем в количестве, соответствующем степени освещенности данной точки поверхности. Изображение фиксируют, нагревая при 120°C в течение 30 с. Отпечатки тонкослойных хроматограмм изготавливают также методом светокопирования [40].

3. ДРУГИЕ МЕТОДЫ

Яковлевич и Бишара [41] описали запоминающее вычислительное устройство, которое обеспечивало быструю выборку данных, полученных методами ТСХ и БХ, позволяло исключить фотографирование или копирование хроматограмм и тем самым уменьшало объем системы памяти.

В тонкослойном электрофорезе с использованием крахмальных гелей удовлетворительная регистрация тонких слоев достигается путем пластифицирования самых тонких слоев [42—47]. В этом методе лучше всего воспользоваться целлофановой подложкой. После окраски и промывки тонкого слоя рекомендуется следующая методика пластифицирования [43]. Слой геля погружают на 5 мин в абсолютный метиловый спирт (эту стадию

можно опустить, если в процессе окраски слой уже обрабатывали метанолом). Затем слой геля и полосу целлофана, помещаемую сверху, на 30 мин погружают в 15 %-ный водный раствор глицерина и 2 %-ный раствор уксусной кислоты (об. %) (для ацетатного буфера, рН 5, необходимо увеличить содержание глицерина до 20 %). Гель и покрывающую целлофановую полосу извлекают из пластифицирующего раствора и помещают на стеклянную пластинку, смоченную этим же раствором. Полоску тщательно разравнивают, чтобы удалить все воздушные пузырьки, а края покровной полоски натягивают во избежание скручивания. Пластинку высушивают потоком теплого воздуха, температура которого не должна превышать 50°C. Такая методика обеспечивает получение сухой и прозрачной копии, которую затем можно подравнять и хранить обычным образом в картотеке. Хотя при высушивании происходит небольшая усадка, она равномерна и не мешает интерпретации электрофореграммы. Таким образом можно высушивать также гели акриламида [48, 49]. В этом случае усадка также равномерная в обоих направлениях, и пленку можно вновь гидратировать до ее первоначальных размеров.

Кригл и др. [50] предложили высушивать электрофореграммы вымораживанием. С этой целью электрофореграмму помещают на 10—20 с в сухой лед, после чего влагу удаляют под вакуумом в эксикаторе, снабженном охлаждаемым конденсатором. Такая методика предотвращает миграцию зон при сушке и позволяет также сохранить нестойкие соединения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 281 (1962).
2. Amenta J. S., *J. Chromatogr.*, **11**, 263 (1963).
3. Scora R. W., *J. Chromatogr.*, **13**, 251 (1964).
4. Ciardi J. E., Anderson E. P., *Anal. Biochem.*, **22**, 398 (1968).
5. Berlet H. H., *J. Chromatogr.*, **21**, 485 (1966).
6. Nybom N., *J. Chromatogr.*, **26**, 520 (1967).
7. Meinhard J. E., Hall N. F., *Anal. Chem.*, **21**, 185 (1949).
8. Mottier M., Potterat M., *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **43**, 123 (1952).
9. Barrollier J., *Naturwissenschaften*, **48**, 404 (1961).
10. Bhandari P. R., Lerch B., Wohlleben G., *Pharm. Ztg., Ver. Apoth.-Ztg.*, **107**, 1618 (1962).
11. Csallany A. S., Draper H. H., *Anal. Biochem.*, **4**, 418 (1962).
12. Lichtenberger W., *Z. Anal. Chem.*, **185**, 111 (1962).
13. Hausser H., *Arch. Kriminol.*, **125**, 72 (1960).
14. Pastuska G., Petrowitz H. J., *Chem.-Ztg.*, **86**, 311 (1962).
15. Brown T. L., Benjamin J., *Anal. Chem.*, **36**, 446 (1964).
16. Ulschoeffler B., Doss M., *J. Chromatogr.*, **44**, 407 (1969).
17. Specht W., Stier A., *Phot. Korr.*, **100**, 187 (1964).
18. Jackson R., *J. Chromatogr.*, **20**, 410 (1965).
19. Gonnet J. F., *J. Chromatogr.*, **86**, 192 (1973).

20. Kay H. L., "Cinematographic de separations chromatographiques sur couches minces", in Chromatogr. Electrophor. Symp. Int., 4th, 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 407.
21. Jones I. D., Bennett L. S., White R. C., J. Chromatogr., 30, 622 (1967).
22. Hansbury E., Langham J., Ott D. G., J. Chromatogr., 9, 393 (1962).
23. Heinz D. E., Vitek R. K., J. Chromatogr., Sci., 13, 570 (1975).
24. Jackson R., J. Chromatogr., 29, 252 (1967).
25. Reitsema R. H., Cramer F. J., Scully N. J., Chorney W., J. Pharm. Sci., 50, 18 (1961).
26. Richardson G. S., Weliky I., Batchelder W., Griffith M., Engel L. L., J. Chromatogr., 12, 115 (1963).
27. Sheppard H., Tsien W. H., Anal. Chem., 35, 1992 (1963).
28. Hilton J., Hall W. B., J. Chromatogr., 7, 266 (1962).
29. Felici R., Franco E., Cristalli M., J. Chromatogr., 90, 208 (1974).
30. Eisenberg F., Jr., J. Chromatogr., 9, 390 (1962).
31. Sprenger H. E., Z. Anal. Chem., 199, 241 (1963).
32. Zeitman B. B., J. Lipid Res., 5, 628 (1964).
33. Getz H. R., Lawson D. D., J. Chromatogr., 7, 266 (1962).
34. Sweeney G. P., J. Chromatogr., 33, 548 (1968).
35. Palmork H., Acta Chem. Scand., 17, 1456 (1963).
36. Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, 1951—1952, p. 2774.
37. Hejendehl F. W., Planta Med., 8, 65 (1960).
38. Hassur S. M., Whitlock H. W., Jr., Anal. Biochem., 62, 609 (1974).
39. Sprenger H. E., Z. Anal. Chem., 199, 338 (1963).
40. Radin N. S., J. Lipid Res., 6, 442 (1965).
41. Jakovljevic I. M., Bishara R. H., J. Chromatogr., 110, 398 (1975).
42. Baur E. W., J. Lab. Clin. Med., 61, 166 (1963).
43. Baur E. W., Nature, 202, 520 (1964).
44. Berkès-Tomašević P., Rosić J., Ignjatović M., Archiv Farm. (Belgr.), 13, 9 (1963).
45. Dangerfield W. G., Nature, 202, 520 (1964).
46. Groulade J., Fine J. N., Ollivier C., Nature, 191, 72 (1961).
47. Groulade J., Ollivier C., Ann. Biol. Clin. (Paris), 18, 595 (1960).
48. Raymond S., Weintraub L., Science, 130, 711 (1959).
49. Quast R., Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 9, 175 (1971).
50. Criddle W. J., Moody G. J., Thomas J. D. R., J. Chromatogr., 18, 530 (1965).

Глава IX

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ R_f

Кирхнер и др. [1, 2] показали, что при тщательном контроле условий работы (стандартизация) воспроизводимость значений R_f может достигать $\pm 0,05$. Два наиболее важных фактора, определяющих воспроизводимость величин R_f , — это тщательное приготовление слоев равномерной толщины, а также регулирование активности слоя путем стандартизации условий сушки и обработки пластинки. Авторы [1, 2] подчеркивают, что чувствительность слоев кремневой кислоты зависит от влажности атмосферы. Поскольку, как выяснилось, на величину R_f оказывает влияние ряд факторов, исследуя неизвестные соединения, параллельно необходимо проводить контрольные опыты со стандартными веществами. Зависимость R_f от толщины слоя подтверждают авторы работ [3—14]. Ямамото и Фурукава [5, 12] наглядно показали влияние толщины слоя, изготовив клинообразные слои. Поддерживая постоянным расстояние, проходящее растворителем, чтобы исключить влияние этого фактора, они продемонстрировали влияние толщины слоя на величину R_f . Приведенные в табл. 9.1 данные Патаки и Келлера [8]

Таблица 9.1

Величины R_f , полученные при различной толщине слоя [8] ^{а, б}

Краситель	0,25 мм		0,5 мм		0,75 мм		1 мм	
	R_f	SR_f	R_f	SR_f	R_f	SR_f	R_f	SR_f
Индифенол	0,056	0,007	0,059	0,004	0,074	0,009	0,078	0,007
Судан красный	0,142	0,008	0,152	0,008	0,171	0,009	0,185	0,011
Цинковый желтый	0,395	0,011	0,402	0,014	0,419	0,016	0,432	0,014

^а С разрешения авторов и Verlag Helvetica Chimica Acta.

^б Среднее значение R_f 80 отдельных опытов.

показывают характер изменения R_f с толщиной слоя. Даллас [15] указывает, что в более толстых слоях теплота адсорбции выше и рассеивается слабее, чем в тонких слоях, и это должно оказывать влияние на R_f .

Количество влаги в адсорбенте, которое непосредственно связано с его активностью, существенно влияет на величины R_f . Табл. 9.2 и 9.3 иллюстрируют влияние активности адсорбента на значение R_f [6, 16]. Влияние влаги столь велико, что при работе с пластинками следует соблюдать осторожность, не держать их слишком долго на воздухе, особенно если эти пластинки высушивали в условиях, отличающихся от атмосферных. Даллас [4] установил, что «более половины общего количества влаги, адсорбированной силикагелем при равновесии (в атмосфере с относительной влажностью 50%), поглощается примерно за 3 мин; величина R_f может измениться, даже если, нанося пятна на хроматограмму, вы будете дышать на пластинку». Гейс и Шлит [17] показали, что слои оксида алюминия, выдержанные в атмосфере с относительной влажностью 65%, поглощают 2% влаги за 6 мин и 3% за 20 мин. Хотя количество поглощенной влаги зависит от атмосферных условий, лучше не выдерживать слои слишком долго перед разделением и получением хроматограммы (как уменьшить экспозицию пластин при нанесении пятен см. в гл. IV).

Гейс и Шлит [17] также показали, что если элюирование хроматограмм проводится при относительной влажности 1 и 80%, полученные значения R_f могут различаться на 300%. Ис-

Таблица 9.2

Влияние активности адсорбента (оксид алюминия) на $R_f \times 100$ красителей [6]^a

Азокраситель	Активность по Брокману и Шроддеру			
	II	III	IV	V
Азобензол	59	74	85	95
<i>n</i> -Метоксиазобензол	16	49	69	89
Судан желтый	1	25	57	78
Судан красный	0	10	33	56
<i>n</i> -Аминоазобензол	0	3	3	19

^a С разрешения авторов и VEB Verlag Volk Gesundheit.

Таблица 9.3

Сравнение величин $R_f \times 100$, полученных на слоях силикагеля G, высушенного в различных условиях [16]^a

Соединение	Растворитель	$R_f (\times 100)$ ^b		
		A	B	B
Индифенол	Бензол	5,0	3,6	2,2
Судан красный G	„	13,0	11,6	10,4
Диметилазобензол	„	37,0	34,2	32,7
ФТГ ^в —глицин	Хлороформ	12,5	11,0	9,7
Метиламин·HCl	<i>n</i> -C ₄ H ₉ OH—CH ₃ COOH—H ₂ O (4:1:1)	16,2	12,5	10,2
Карбобензоксиглицин	<i>n</i> -C ₃ H ₇ OH—H ₂ O (7:3)	59,9	53,5	51,1
Карбобензоксипаланин	То же	61,4	55,2	53,1
Глицин	Фенол—H ₂ O (75:25)	22,4	20,0	18,6

^a С разрешения авторов и Springer-Verlag^b A — высушен в течение ночи на воздухе, B — высушен в теплом воздухе, затем 30 мин при 110°C; B — высушен в теплом воздухе, затем 30 мин при 120°C^в Фенилтиогидантоин.

ходя из этих результатов, Гейс и др. [18] провели обширное исследование влияния влаги на R_f полифенилов и соответственно на разделение смесей этих соединений. Чтобы можно было тщательно контролировать температуру и влажность при разделении, была сконструирована специальная камера. Бедингс [19] обнаружил, что при повышенной влажности не удается разделить ряд 2,4-динитрофенилгидразонов.

Влияние влажности на R_f изучали многие авторы [4, 20—30] и обнаружили, что воспроизводимые результаты можно получить, только поддерживая влажность постоянной.

Помимо влажности на величину R_f оказывает влияние степень насыщения или отсутствия такого насыщения парами растворителя атмосферы камеры, в которой проводят разделение [4, 7, 31—40]. Зависимость R_f от степени насыщения объясняется следующим. В отсутствие насыщения растворитель испаряется из слоя и в результате количество растворителя, прошедшее слой, увеличивается. Поэтому значения R_f , полученные

в ненасыщенной атмосфере, выше полученных в насыщенной атмосфере [1, 41]. Хонеггер [7] исследовал влияние насыщения атмосферы камеры, температуры разделения и активности адсорбента (силикагель G) на величины R_f для слоев с постепенно увеличивающейся толщиной и обнаружил, что наибольшее влияние на разделение оказывает активность адсорбента.

Изучение зависимости R_f от температуры [4, 7, 12, 42—45] показало, что, за редкими исключениями, изменение температуры не оказывает существенного влияния на результаты определения R_f . В тех немногих случаях, когда такое влияние наблюдалось, R_f с повышением температуры увеличивалась, что, по-видимому, связано с более интенсивным испарением из слоя, приводящим к увеличению количества растворителя, перемещающегося по слою. Естественно, что влияние температуры должно быть большим в камерах с совершенно ненасыщенной или лишь частично насыщенной атмосферой и лишь едва заметным в камере с полностью насыщенной атмосферой (при условии герметизации камеры во избежание потерь паров растворителя).

Влияние расстояния между уровнем растворителя и точкой нанесения пятна на величину R_f зависит от типа адсорбента, природы разделяемого вещества и применяемой системы растворителей [11, 35, 44, 50].

Фурукава [44] показал, что если разделение смеси компонентов с более высокими и более низкими значениями R_f проводится с применением двухкомпонентной системы растворителей, указанное расстояние влияет на величину R_f . Это объясняется фактически происходящим на слое разделением компонентов смеси растворителей. Соединения с более высокими значениями R_f перемещаются по слою с менее полярным растворителем, и в этом случае расстояние между уровнем растворителя и точкой нанесения пятна не оказывает влияния на величину R_f ; на величины R_f соединений с более низкими значениями R_f расстояние между уровнем растворителя и точкой нанесения оказывает влияние. Вследствие разделения растворителей на слое, чем выше расположена точка нанесения, тем больше времени необходимо смеси растворителей, чтобы достичь пятна и начать его перемещать по слою.

Естественно, что общее расстояние, на которое перемещается растворитель, влияет на величину R_f [10, 35, 50], поскольку с увеличением пройденного растворителем пути увеличивается смещение пятен. Полученные значения R_f зависят от размеров нанесенной пробы, и степень этого влияния опять-таки определяется типом разделяемых соединений [1, 3, 42, 43, 51—53]. Черн и др. [53] на примере стероидов показали, что значения

R_f для проб 50—200 мкг не зависят от концентрации; для проб менее 50 мкг величины R_f зависят от концентрации. Поскольку характер этого влияния меняется в зависимости от различных обстоятельств, каждый случай следует рассматривать отдельно [42]. Получаемые значения R_f могут зависеть также от того, как наносят пробу на пластинку: сразу всю или несколькими порциями с тем, чтобы дать растворителю испариться [51]. Нанесение пробы в несколько приемов в одно пятно приводит к радиальному хроматографированию, что влияет на форму пятна и величину R_f . При нанесении пробы следует по возможности пользоваться малополярным растворителем. Применение спирта в качестве растворителя пробы при разделении терпенов [1] не только влияет на величины R_f , но приводит также к образованию полос на пятнах. Из-за наличия примесей и большого числа компонентов в пробе найденные значения R_f могут отличаться от соответствующих R_f чистого вещества, использованного в качестве стандарта.

Размер частиц адсорбента оказывает существенное влияние на величину R_f , причем для более мелких частиц имеет место тенденция к увеличению R_f [11, 55—58]. Эбинг [57] советует пользоваться просеянными адсорбентами с частицами размером 20—60 мкм при допустимом отклонении размера частиц в 10 мкм.

Величина R_f зависит не только от размера частиц, но и от удельной поверхности и диаметра пор [58—61]. Чтобы воспроизводимость значений R_f была приемлемой, важно использовать адсорбент с узким распределением пор и частиц по размерам [61]. Адсорбенты различного происхождения отличаются размерами частиц, объемом и диаметром пор, величиной поверхности, распределением частиц по размерам и числом активных мест. Колебания в свойствах адсорбентов наблюдаются для различных партий, даже если они изготовлены на одном и том же предприятии. Все эти факторы оказывают влияние на величины R_f , и поэтому не приходится особенно удивляться, что значения R_f колеблются от лаборатории к лаборатории. Френч и др. [62] и Рабек [63] обнаружили обратную последовательность значений R_f при использовании готовых предварительно нанесенных слоев различного происхождения.

Ландмарк и др. [64] исследовали влияние добавки к адсорбентам сцинтилляторов. Антрацен несколько смещает значения R_f , а силикат цинка меняет значения R_f и разделительные свойства слоя.

В зависимости от типа растворителей их повторное применение может оказать влияние на значения R_f ; так, например, изменение R_f может быть обусловлено потерей более летучих

компонентов [65] или разбавлением растворителя летучими компонентами разделяемой смеси [1]. Даже относительно нелетучие смеси элюентов могут изменить свой состав из-за селективной адсорбции одного из компонентов на тонком слое.

Приводя данные о полученных значениях R_f , следует указать метод элюирования; так, метод восходящего элюирования дает значения R_f , отличающиеся от значений, полученных методом нисходящего или горизонтального элюирования.

Давидек и Яничек [66] исследовали влияние концентрации парафинового масла в пропитанных тонких слоях крахмала на значения R_f и пришли к выводу, что при разделении жирорастворимых красителей оптимальная концентрация составляет 10%. Эта величина, конечно, может меняться в зависимости от типа соединения и растворителя. Указанные авторы исследовали также влияние длительности сушки, проводимой с целью удаления используемого при пропитке растворителя (петролейный эфир), на значения R_f и установили, что при комнатной температуре для этого достаточно 20 мин.

Что же касается фактической воспроизводимости значений R_f в ТСХ, то Бреннер и др. [42] методом статистического анализа показали, что величины R_f , получаемые в ТСХ, столь же хорошо воспроизводятся, как и аналогичные величины в хроматографии на бумаге. Это, конечно, справедливо, только если достигается идентичность условий получения тонкослойных хроматограмм.

Донт и сотр. [67—69] показали, что, применяя два внутренних стандарта и пользуясь для расчетов уравнением Галаноса и Капулоса [70], можно скорректировать значения R_f и в тех случаях, когда условия опыта неполностью стандартизованы.

Смит и сотр. [1] составили подробный перечень условий, которые, по их мнению, следует указывать при публикации значений R_f , чтобы другие авторы имели возможность повторить работу. Этот перечень включает следующее:

1. Конструкция и размеры камеры для разделения.
2. Способ герметизации камеры.
3. Наличие у камеры коммуникационных линий для насыщения.
4. Условия насыщения атмосферы камеры парами растворителя.
5. Температура опыта.
6. Влажность и относительная влажность.
7. Фирма, поставляющая материалы для изготовления тонких слоев.
8. Кем нанесены тонкие слои на пластинки: фирмой-изготовителем или самим исследователем.

9. Толщина слоя, количество граммов адсорбента на миллилитр воды или другого растворителя, применяемого для покрытия, тип подложки.
10. Связующие, флуоресцирующие вещества, буферы, вещества, используемые для модификации сорбента.
11. Метод активирования слоя.
12. Методы элюирования, например нисходящий или восходящий.
13. Устройство для нанесения пробы.
14. Расстояние от края пластинки до пятна.
15. Число пластинок в камере.
16. Продолжительность опыта и расстояние, пройденное растворителем.
17. Состав смеси растворителей и чистота растворителей.
18. Размеры пятна или полосы.
19. Растворитель, примененный при нанесении пробы.
20. Количество нанесенной пробы.
21. Метод нанесения, например на открытом воздухе, в атмосфере азота, при покрытии стеклянной пластинкой.

Следует помнить, что даже когда полученное значение совпадает с R_f известного соединения, это говорит лишь о возможной идентичности веществ, которую еще необходимо подтвердить другими методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
2. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 25, 1107 (1953).
3. Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H. A., Suppan F., Z. Naturforsch., 17B, 352 (1962).
4. Dallas M. S. J., J. Chromatogr., 17, 267 (1965).
5. Furukawa T., Nippon Kagaku Zasshi, 80, 45 (1959); Chem. Abstr., 54, 4107 (1960).
6. Hěrmánek S., Schwarz V., Čekan Z., Pharmazie, 16, 566 (1961).
7. Honegger C. G., Helv. Chim. Acta, 46, 1772 (1963).
8. Pataki G., Keller M., Helv. Chim. Acta, 46, 1054 (1963).
9. Shellard E. J., Res. Develop. Ind., 1963, No. 21, 30.
10. Stahl E., Schroeter G., Kraft G., Renz R., Pharmazie, 11, 633 (1956).
11. Starka L., Hampl R., J. Chromatogr., 12, 347 (1963).
12. Yamamoto K., Furukawa T., J. Fac. Educ. Hiroshima Univ., 4, 37 (1956).
13. Щербакoва М. Н., Труды 1-го Московского медицинского института, 61, 197 (1968).
14. Geiss F., J. Chromatogr., 33, 9 (1968).
15. Dallas M. S. J., J. Chromatogr., 33, 193 (1968).
16. Kelemen J., Pataki G., Z. Anal. Chem., 195, 81 (1963).
17. Geiss F., Schlitt H., Naturwissenschaften, 50, 350 (1963).
18. Geiss F., Schlitt H., Ritter F. J., Weimar W. M., J. Chromatogr., 12, 469 (1963).

19. *Badings H. T.*, J. Chromatogr., **14**, 265 (1964).
20. *Sandroni S., Geiss F.*, Chromatogr., **2**, 165 (1969).
21. *Chmel K.*, J. Chromatogr., **97**, 131 (1974).
22. *De Zeeuw R. A.*, J. Chromatogr., **33**, 227 (1968).
23. *Geiss F., Van der Venne M. T.*, Int. Symp. Chromatogr., Electrophor., Lect. Pap., 4th 1966, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1968, p. 153.
24. *Reichel W. L.*, J. Chromatogr., **26**, 304 (1967).
25. *Geiss F., Schlitt H., Klose A.*, Z. Anal. Chem., **213**, 21 (1965).
26. *Prinzler H. W., Tauchmann H.*, J. Chromatogr., **29**, 142 (1967).
27. *Pitra J.*, J. Chromatogr., **33**, 220 (1968).
28. *Versino C., Fogliano L., Ciaretti F.*, Riv. Combust., **20**, 527 (1966); through Chem. Abstr., **66**, 72254w (1967).
29. *Peter H. W., Wolf H. U.*, J. Chromatogr., **82**, 15 (1973).
30. *Geiss F., Schlitt H., Klose A.*, Z. Anal. Chem., **213**, 331 (1965).
31. *Honegger C. G.*, Helv. Chim. Acta, **46**, 1730 (1963).
32. *Lisboa B. P., Diczfalusy E.*, Acta Endocrinol., **40**, 60 (1962).
33. *Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E.*, J. Am. Oil Chem. Soc., **40**, 425 (1963).
34. *Sankoff I., Sourkes T. L.*, Can. J. Biochem. Physiol., **41**, 1381 (1963).
35. *Shellard E. J.*, Lab. Pract., **13**, 290 (1964).
36. *Jaenchen D.*, J. Chromatogr., **33**, 195 (1968).
37. *Lamotte A.*, Bull. Soc. Chim. Fr., **1971**, 1509.
38. *Naghizadeh-Nouniaz H., Lamotte A.*, Bull. Soc. Chim. Fr., **1971**, 1515.
39. *Geiss F., Schlitt H.*, Chromatogr., **1**, 387 (1968).
40. *De Zeeuw R. A., Compaan H., Ritter F. J., Dhont J. H., Vinkenburg C., Labadie R. P.*, J. Chromatogr., **47**, 382 (1970).
41. *de Zeeuw R.*, J. Chromatogr., **33**, 222 (1968).
42. *Brenner M., Niederwieser A., Pataki G., Fahmy A. R.*, Experientia, **18**, 101 (1962).
43. *Cone N. J., Miller R., Neuss N.*, J. Pharm. Sci., **52**, 688 (1963).
44. *Furukawa T.*, J. Sci. Hiroshima Univ. Ser., **A21**, 285 (1958); Chem. Abstr., **53**, 809 (1959).
45. *Kirchner J. G., Flanagan V. P.*, 147th Meeting of the American Chemical Society, April, 1964, Philadelphia, Pa.
46. *Berlet H. E., Voelkl A.*, J. Chromatogr., **71**, 376 (1972).
47. *Pastuska G. H., Krueger R., Lehmann V.*, Chem.-Ztg., **95**, 414 (1971).
48. *Geiss F., Schlitt H.*, J. Chromatogr., **33**, 208 (1968).
49. *Singh E. J., Gershbein L. L.*, J. Chromatogr., Sci., **8**, 162 (1970).
50. *Furukawa T.*, J. Fac. Educ. Hiroshima Univ., **3**, 53 (1955).
51. *Abbott D. C., Egan H., Hammond E. W., Thompson J.*, Analyst (London), **89**, 480 (1964).
52. *Brenner M., Niederwieser A.*, Experientia, **16**, 378 (1960).
53. *Cerný V., Joska J., Lábler L.*, Collect. Czech. Chem. Commun., **26**, 1658 (1961).
54. *Brain K. R.*, J. Chromatogr., **75**, 124 (1973).
55. *Vaedtke J., Gajewska A., Czarnocka A.*, J. Chromatogr., **12**, 208 (1963).
56. *Yamamoto K., Furukawa T., Matsukura M.*, J. Fac. Educ. Hiroshima Univ., **5**, 77 (1957).
57. *Ebing W.*, J. Chromatogr., **44**, 81 (1969).
58. *Halpapp H.*, J. Chromatogr., **78**, 77 (1973).
59. *Waksmundzki A., Rózyło*, Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia Sect. AA, **1965**, **20**, 93 (1967); through Chem. Abstr., **69**, 49053h (1968).
60. *Waksmundzki A., Rózyło J.*, J. Chromatogr., **33**, 90 (1968).
61. *Vanhaelen M.*, Ann. Pharm., Fr., **26**, 565 (1968).
62. *French W. N., Matsui F., Smith S. J.*, J. Chromatogr., **86**, 211 (1973).
63. *Rábek V.*, J. Chromatogr., **33**, 186 (1968).

64. *Landmark L. H., Hognestad A. K., Prydz S.*, J. Chromatogr., **46**, 267 (1970).
65. *Battaille J., Dunning R. L., Loomis W. D.*, Biochem. Biophys. Acta, **51**, 538 (1961).
66. *Davidek J., Janicek G.*, J. Chromatogr., **15**, 542 (1964).
67. *Dhont J. H., Vinkenburg C., Compann H., Ritter F. J., Labadie R. P., Verweij A., De Zeeuw R. A.*, J. Chromatogr., **71**, 283 (1972).
68. *Dhont J. H., Vinkenburg C., Compann H., Ritter F. J., Labadie R. P., Verweij A., De Zeeuw R. A.*, J. Chromatogr., **47**, 376 (1970).
69. *Dohnt J. H., Mulders-Dijkman G. J. C.*, Chem. Tech. (Amsterdam), **24**, 761 (1969); through Chem. Abstr., **72**, 93635k (1970).
70. *Galanos D. S., Kapoulas V. M.*, J. Chromatogr., **13**, 128 (1964).
71. *Smith I., Baitsholts A. D., Boulton A. A., Randerath K.*, J. Chromatogr., **82**, 159 (1973).

Глава X

ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

1. ПРИМЕНЕНИЕ КОЛОНОК

Первым примером применения метода тонких слоев для препаративных целей может служить опубликованная в 1951 г. работа Миллера и Кирхнера [1]. Эти авторы проводили разделение исследуемых соединений на «хроматографических стержнях» — колонках без оболочки. Изготавливали такие колонки они следующим образом: с помощью алебаstra закрепляли адсорбент вокруг стеклянных палочек круглого или квадратного сечения. Стеклянные палочки придавали механическую прочность таким колонкам. Далее на один из концов колонки наносили пробу и затем прижимали ее к рыхлому слою сульфата кальция, в свою очередь расположенному на специальном распределительном устройстве для элюента.

Элюирование пробы на колонке происходило под действием сил капиллярного поднятия. На рис. 10.1 приведена установка для элюирования такого «хроматографического стержня». Описанным способом удается без труда изготовить колонки сечением до 25 см². Поскольку стержни лишены стеклянных оболочек, их несложно приготовить, легко извлечь из камеры для элюирования и опрыскать обнаруживающим раствором.

Поверхностный слой, подвергнутый опрыскиванию, можно соскрести, чтобы удалить раствор, использованный для обнаружения, а хроматографический стержень вновь погрузить в элюент. По окончании разделения, после того как колонку разрезали ручной пилой на части, применявшееся для обнаружения компонентов вещество удаляют (соскребают) с поверхности, чтобы предотвратить загрязнение пробы. На рис. 10.2 показано разделение некоторых терпенов на хроматографических стержнях. Этой методикой пользовались и другие исследователи [2—5].

В 1952 г. Миллер и Кирхнер [6] разработали еще одну препаративную методику, особенно полезную в тех случаях, когда, чтобы выделить несколько меньших фракций, приходится перерабатывать очень большие количества вещества. Согласно этой методике, обнаружение компонентов пробы методом ТСХ проводится после их предварительного разделения на хроматографических колонках. Прежде чем проводить разделение на ко-

лонках, на хроматографических полосках (тонкие слои на узких стеклянных полосках) определяют наиболее подходящие растворители и адсорбенты. Элюаты из колонок собирают в виде отдельных фракций с помощью специального сборника. При-

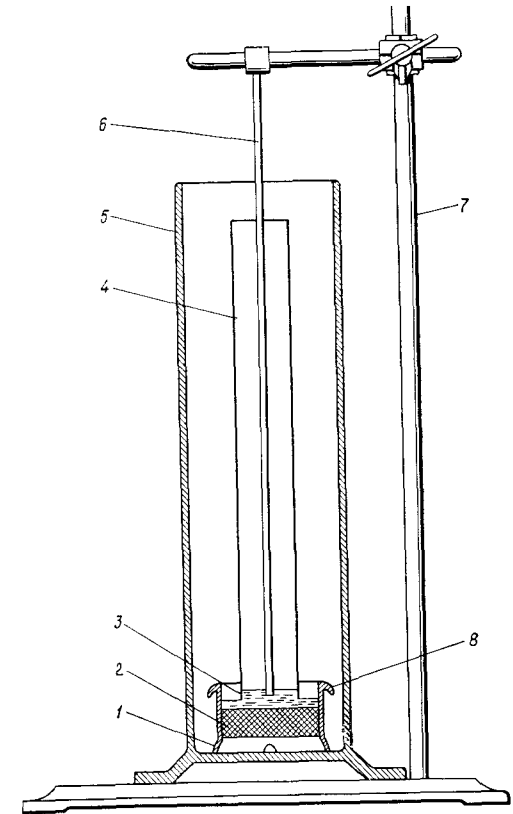


Рис. 10.1. Прибор для разделения на хроматографических стержнях (описание см. в тексте) [1] (с разрешения *Am. Chem. Soc.*).

1 — устройство для подачи элюента; 2 — гипсовая пробка; 3 — незакрепленный слой CaSO_4 ; 4 — хроматографический стержень; 5 — цилиндр; 6 — стеклянный стержень; 7 — кольцевой штатив; 8 — скобы для удаления устройства для подачи элюента.

мерно после каждой пятой фракции проверяют эффективность разделения; наносят каплю элюата на хроматографическую полосу и элюируют его тем же самым растворителем, который был использован для разделения на колонке. Такой отбор проб позволяет определить, какая из порций элюата содержит требуемое вещество. После обнаружения фракции, содержащей более одного вещества, проводят анализы методом ТСХ, отбирая последовательно пробы в начале и конце фракции с тем, чтобы установить начало появления чистых фракций. (Схема такого анализа показана на рис. 10.3.) Чтобы избежать образования

типичных конусообразных хроматографических зон, возникающих при обычном заполнении колонки сухим методом, Миллер и Кирхнер заполняли колонки густой суспензией.

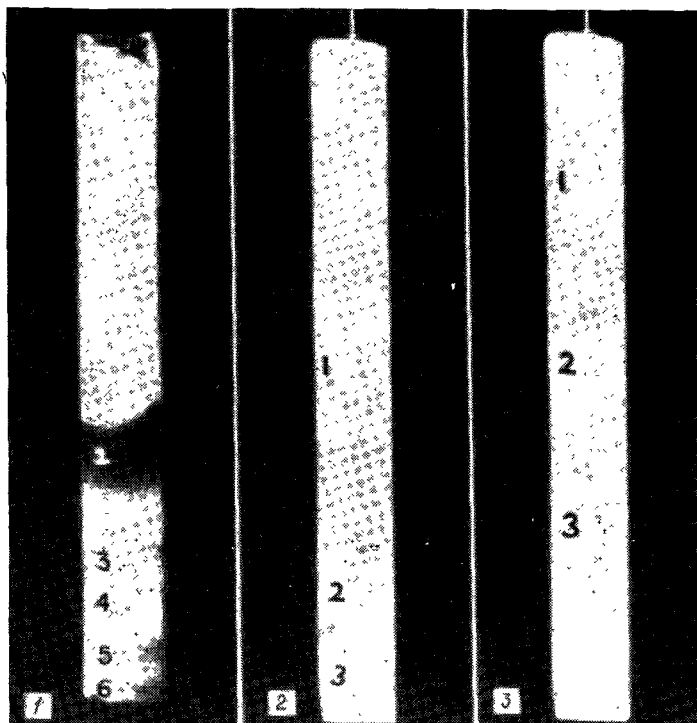


Рис. 10.2. Некоторые примеры разделения на хроматографических стержнях [1] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

А. Хроматограмма сырого изоэвгенола на хроматографическом стержне из диоксида кремния с флуоресцирующей добавкой, полученная со смесью гексан—этилацетат (85 : 15): 1 — фронт растворителя; 2 — изоэвгенол; 3—6 — неизвестные примеси. Б. Разделение методом ступенчатого элюирования: 1 — лимонен; 2 — терпинилацетат; 3 — α -терпинеол. Первое разделение проведено гексаном на расстояние 10 см, второе — смесью гексан—этилацетат (85 : 15). Всего растворитель переместился на 25 см. Детектирование осуществлялось реактивом флуоресцин—бром [2]. В. Разделение смеси 17 мг α -пинена (1), 10 мг терпинилацетата (2) и 10 мг терпинеола (3); детектирование проводилось смесью флуоресцин—бром [2].

Дан и Фукс [7] применяли сходную методику разделения. Они помещали адсорбент в целлофановые трубочки. Колонки заполняли сухим адсорбентом, после чего вводили пробу и сверху наносили дополнительный слой сухого адсорбента. Колонку укрепляли в горизонтальном положении, растворитель-элюент перемещался под действием капиллярных сил. После

первоначального обнаружения зон, наблюдаемого в видимом или УФ-свете, или после добавления к адсорбенту флуоресцирующих веществ колонку разрезали на секции. Если проводилось

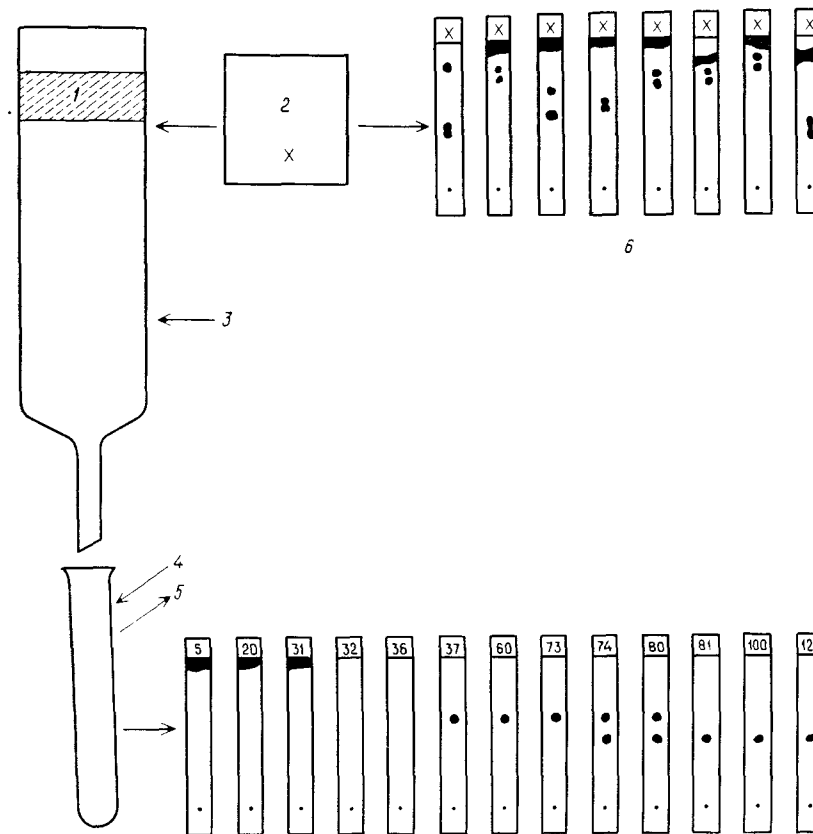


Рис. 10.3. Применение тонкослойной хроматографии для проверки препаративного разделения на колонках [5] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

1 — растворитель С; 2 — летучее масло; 3 — адсорбент — обработанная крахмалом кремневая кислота; 4 — большое число отобранных фракций; 5 — систематически отобранные фракции, разделенные на «хроматографических полосках» для локализации зон; 6 — лучший растворитель для разделения выбран методом разделения на «хроматографических полосках».

разделение аминокислот, в колонке первоначально прорезали щель и прижимали к адсорбенту полосу фильтровальной бумаги. Перешедшее на нее небольшое количество аминокислот элюировали нингидриновым реактивом. Разделенные на секции зоны анализировали далее методом ТСХ.

2. РАВНОМЕРНЫЕ ТОНКИЕ СЛОИ

Тонкослойные пластинки обычно с более толстыми слоями используются непосредственно и в препаративной хроматографии. Риттер и Майер [8] предпочитают слои толщиной 1 мм, поскольку более толстые слои не всегда обеспечивают хорошее разделение. Приготавливают такие слои обычным методом, хотя для улучшения результатов можно ввести некоторые усовершенствования. Хонеггер [9] советует постепенно менять отношение адсорбента к воде от 1:2 до 1:1,57 для слоев силикагеля G толщиной от 1 до 5 мм. Для оксида алюминия G это отношение должно составлять 1:0,9. Чтобы уменьшить вероятность растрескивания более толстых слоев, Хонеггер добавлял к силикагелю 2 % алебаstra. Длительность сушки увеличивали до 60 мин и дополнительно проводили облучение ИК-светом. Длительность активации при 110°C увеличили от 1/2 до 24 ч. Однако при соблюдении всех этих мер предосторожности примерно в 50 % слоев 5-миллиметровой толщины обнаруживают трещины при высушивании. Корзун и др. [10], чтобы избежать растрескивания толстых слоев, помещали пластинки перед сушкой на 12 ч в печь при 80°C. Мистрюков [11] и Черни и др. [12] использовали в препаративной ТСХ незакрепленные слои оксида алюминия. Эти же авторы предложили для препаративных работ незакрепленные слои силикагеля.

Хоробин [13] проводил препаративное разделение на листах с тонкими слоями методом восходящего хроматографирования. Йохансон и Катемсанта [14] проводили и нисходящее хроматографирование, но на пластинках с тонким слоем. Поскольку, чтобы получить указанным методом препаративные количества вещества, необходимо работать с большим числом пластинок, фон Аркс [15] сконструировал резервуары и держатели для одновременного элюирования 40 метровых пластин. Иордан [16, 17] применял цилиндрические слои, которыми покрывали наружную поверхность больших пробирок. Келис и др. [18] проводили разделение на незакрепленных слоях толщиной 0,7 см, которые помещали в металлическую коробку, наклоненную под углом в камере для разделения. Кларк [19] отливал 5-миллиметровые слои также в металлических коробках. В обоих случаях слой доступен только с одной стороны и зона перемещается под углом, а не перпендикулярно пластинке. Брендел и др. [20] получали в стеклянной усеченной пирамиде конические слои. Штутц и др. [21] после одновременного элюирования двух пластин, скрепленных скобами лицевыми сторонами друг к другу, пропускали растворитель в направлении, перпендикулярном направлению первоначального элюирования. Виссер

[22] разработал прибор для непрерывной препаративной тонкослойной хроматографии, при которой тонкий слой готовится непрерывно и сушится на движущейся ленте. На движущийся слой наносят пробу, разделяют, разделенное вещество удаляют с ленты и, наконец, использованный адсорбент соскребают.

Боккемюллер и Кайзер [23] использовали блоки сульфата кальция для препаративного электрофореза, разделяя за один раз до 1 г вещества. Аффонсо [24—26] проводил хроматографирование на пластинках сульфата кальция толщиной 1—5 мм, однако в этом случае возможности разделения ограничены адсорбционной емкостью сульфата кальция.

Нанести пробу на тонкий слой в препаративной работе несколько труднее, чем в обычной ТСХ. Пытаясь упростить эту задачу, хроматографисты разработали ряд методов. В соответствии с одним из них пипетку с пробой перемещают по краю пластинки, при этом проба вытекает на пластинку. Однако если поток пробы и скорость движения пипетки не регулируются очень тщательно, проба может быть нанесена неравномерно. Хонеггер [9] наносил пробы в V-образный желоб шириной 1—2 мм, глубина которого была равна половине толщины слоя адсорбента. Следует следить за тем, чтобы при нанесении пробы со стеклянной пластинки не удалялся адсорбент, так как это нарушит движение элюента. Конноли и др. [27] пользовались несколько иной методикой. В слое адсорбента делают два глубоких (до стеклянной пластинки) разреза, оставляя между ними рубец из адсорбента шириной примерно 3 мм. Из разрезов сдувают крошки адсорбента. После этого на рубец с помощью медицинской капельницы или каким-либо другим способом как можно более равномерно подают раствор. Растворитель испаряют, а разрезы заполняют сухим адсорбентом, для чего накладывают на них алюминиевую фольгу с продольной щелью в 1 мм и шпатель запрессовывают сухой адсорбент в разрезы. После удаления фольги проводят обычным образом хроматографическое разделение, не опасаясь высыпания адсорбента.

Халпаап [28] использовал для препаративных работ описанную выше методику нанесения пробы на препаративные пластинки. Основная особенность этой методики состоит в следующем. Стартовую линию перемещают на расстояние 1 см над исходной линией нанесения пробы, применяя для этой цели растворитель, с помощью которого все компоненты легко перемещаются. После удаления растворителя такую пластинку можно хроматографировать обычным образом.

Мы рекомендуем обратить внимание на гл. IV, в которой описаны и показаны устройства для нанесения проб.

Количество пробы, которое можно нанести на данную препаративную пластинку, зависит от размеров последней, толщины

слоя адсорбента и от природы пробы. Хонеггер [9] наносил от 5 до 25 мг пробы на миллиметр толщины слоя для пластины 20×20 см силикагеля G. Корзун и др. [10] наносили от 100 до 500 мг соединений на пластинку 22×33 см, покрытую слоем в 1 мм. Халпаап [28] использовал пластинки шириной 20 см и длиной 1 м с толщиной слоя силикагеля 1,5 мм

Зееув и Висбик [29] применяли программирование паров для препаративных слоев толщиной 1 см.

Одна из проблем, возникающая при проведении препаративных работ,— это обнаружение зон. Все многочисленные реактивы, которые вполне пригодны в обычной ТСХ, в данной ситуации нельзя использовать, так как они загрязняют пробы. Конечно, если соединения окрашены или флуоресцируют в УФ-свете, затруднений не возникает, слой с флуоресцирующими веществами [30] можно с успехом применять, если соединения поглощают в УФ-области. Вещества, содержащие радиоактивный атом, можно, конечно, обнаружить, получив автордиограмму, или с помощью счетчика [31].

Один из методов обнаружения зон заключается в опрыскивании силикагеля водой [32, 33]. Пластины, смоченные водой, становятся прозрачными, и полосы обнаруживаются в виде белых зон. Более четкие зоны можно иногда получить, высушивая насыщенные пластинки. Авторы работы [34] проводили обнаружение зон липидов с помощью иода. Однако Нихамен и др. [35] показали, что при этом занижается содержание ненасыщенных липидов, что, по-видимому, обусловлено иодированием двойных связей.

Работая с незакрепленными слоями, Мистрюков [11] накладывал на слой узкие полоски увлажненной бумаги. Затем он удалял полоски и опрыскивал прилипший адсорбент соответствующим реактивом. Похожую методику применяла и Добязова [36]. Узкую пластинку, покрытую кремневой кислотой, прижимают к боковой поверхности препаративной хроматограммы, чтобы получить «отпечаток», который затем элюируют обычным методом. В некоторых случаях большую часть пластины покрывают стеклянной пластинкой или фольгой, чтобы изолировать один или оба края хроматограммы, которую можно опрыскать соответствующим реактивом. Таким образом удается установить общее расположение зон, однако, если зоны плохо разделены или размыты, возможно их смешение.

После того как зоны локализованы, их можно просто соскрести с пластины в воронку с пористым стеклянным фильтром и элюировать соответствующим растворителем. Разработано ряд устройств для удаления зон; все они предусматривают вакуумное отсасывание. В 1955 г. Моттье и Поттер [37] предложили первое из таких устройств. Оно предназначалось для из-

влечения отдельных пятен из незакрепленных слоев с помощью вакуумного насоса. Адсорбент засасывается в 6—8-миллиметровую трубку и удерживается ватным тампоном. Чтобы сам тампон не засасывался в насос, трубка в этом месте должна быть сужена. Ватный тампон можно заменить на тампон из стеклянной ваты [38, 39] или защитный слой из асбеста, нанесенный на сетку из нержавеющей стали (200 меш) [40]. Голдрик и Хирш [41], Хэнсон [42] и Мэтьюс и др. [43] удерживали

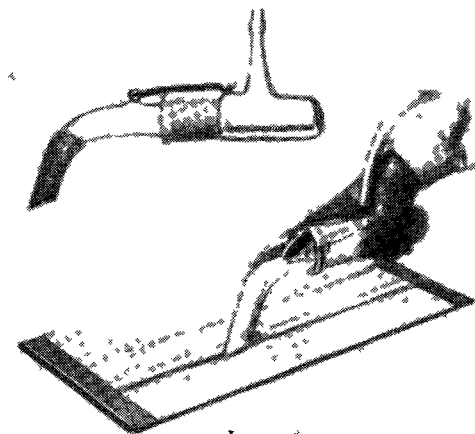


Рис 10.4 Вакуумный приемник для удаления тонкослойных полос (с разрешения Brinkmann Instruments)

адсорбент на дисках из спеченного стекла. Чтобы увеличить скорость всасывания, к основной трубке с помощью короткого отрезка пластмассовой или резиновой трубки подсоединяли стеклянную трубку с вытянутым кончиком [44].

Хей и др. [45] и Спикнер и Тауни [46] отсасывали участки адсорбента с пятнами непосредственно в небольшие пробирки или в мерные колбочки, содержащие элюирующий растворитель, доводили объем раствора до метки и отбирали на анализ аликвотные части.

Риттер и Майер [8] сконструировали коллектор, содержащий наперсток экстрактора Сокслета в качестве приемника адсорбента. Вводная труба снабжена отрезком пластмассовой трубки, чтобы обеспечить хороший контакт со стеклянной пластинкой, не поцарапав последнюю. Материал, собранный с ряда пластинок, экстрагировали в приборе Сокслета. Оборудование для этой конструкции поставляется в продажу фирмой Desaga как в микро-, так и в макроразмерах (рис 10.4)

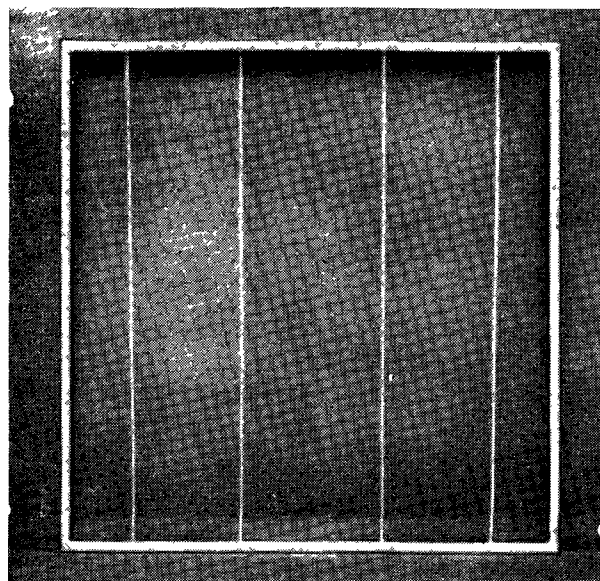


Рис. 105 Рама из нержавеющей стали с параллельными нитями проволоки для удерживания адсорбента [47] (с разрешения Elsevier Scientific Publishing Co.).

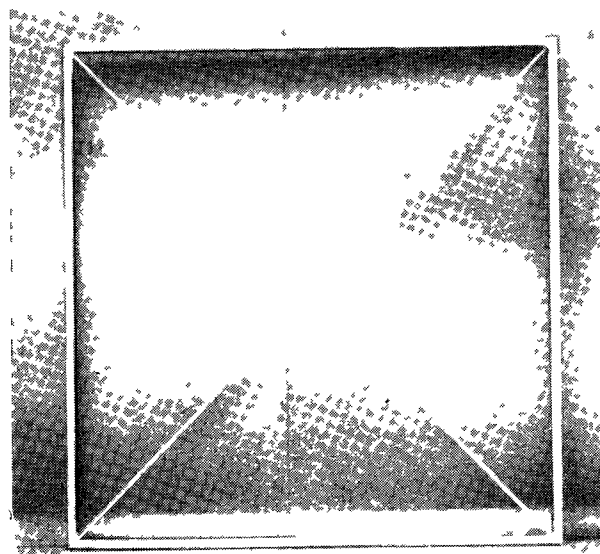


Рис. 106 Рама из нержавеющей стали с диагональными нитями проволоки [47] (с разрешения Elsevier Scientific Publishing Co.)

3. ПРИМЕНЕНИЕ ОЧЕНЬ ТОЛСТЫХ СЛОЕВ

Кирхнер [47] разработал для препаративных целей метод приготовления и элюирования толстых слоев — от 3 до 12,7 мм.

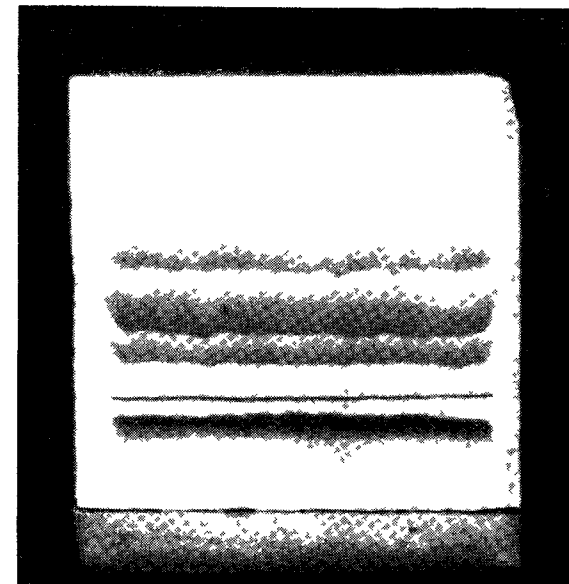


Рис. 107 Разделение смеси шести красителей по 100 мг каждого на слое силикагеля ($0,6 \times 20 \times 20$ см) без подложки. Смесь составлена из следующих красителей (на хроматограмме показаны сверху вниз) желтый ОВ, судан I, судан III, судан II, метиловый красный и кристаллический фиолетовый. Все красители предварительно были очищены методом ТСХ [47] (с разрешения Elsevier Scientific Publishing Co.)

Некоторые условия разделения 1) в камере с ненасыщенной атмосферой разделение ведется доверху смесью бензол—хлороформ (10 1), 2) разделение ведется в той же камере с той же смесью растворителей, но на расстоянии 120 мм 3) разделение ведется бензолом в той же камере на расстоянии 120 мм 4) камера с насыщенной атмосферой, разделение ведется доверху смесью бензол—хлороформ (10 1), 5) камера с ненасыщенной атмосферой разделение проводится дважды доверху, элюент — бензол. 6) камера с ненасыщенной атмосферой разделение проводится на расстоянии 63 мм смесью бензол—хлороформ с добавлением этанола (10 3) Адсорбент Mallinckrodt Silic AR TLC 7L с 20 % (от массы адсорбента) гипса в качестве связующего

У этих слоев отсутствует поддерживающая задняя пластинка, их помещают в каркас из нержавеющей стали, в котором адсорбент поддерживают тонкие проволочки из нержавеющей стали, натянутые поперек рамки (рис 105, 10.6). Эти тонкие проволочки не мешают разделению. Пробу можно наносить на слой с обеих сторон и наблюдать за разделенными зонами.

Изучение поперечных срезов хроматограмм показывает, что при таком способе нанесения пробы с двух сторон в результате диффузии распределение в плоскости сечения слоя зоны выравнивается даже при толщине слоя порядка 13 мм. Слои содержат силикагель и 20 % (в расчете на силикагель) гипса в качестве

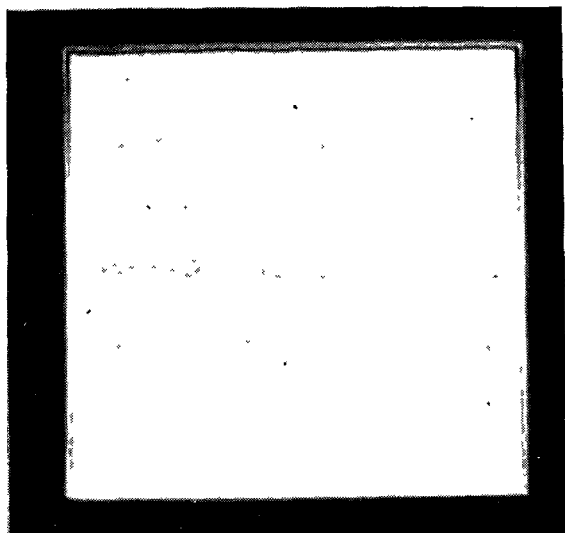


Рис. 10.8. Очистка 500 мг судана II на слое силикагеля (0,6×20×20 см) (Mallinckrodt Silic AR TLC-7F с 20 % гипса в качестве связующего), помещенном на каркас из нержавеющей стали. Слой не имеет задней пластины и доступен с двух сторон. Элюирование проводилось дважды смесью бензол—хлороформ (20:1) в камере с ненасыщенной атмосферой [47] (с разрешения Elsevier Publishing Co.).

связующего; можно, правда, использовать и другие адсорбенты. Пластина толщиной 6 мм содержит 147 г смеси адсорбента и связующего (фирма Mallinckrodt SilicAR), тогда как на обычной пластинке толщиной 250 мкм только 4,4 г смеси. Слой толщиной 6 мм эквивалентен, таким образом, 33 обычным пластинкам, а слой толщиной 13 мм эквивалентен 66 обычным пластинкам. Поскольку слои отливают в формах из нержавеющей стали, подвергнутой машинной обработке с выдерживанием точных размеров, такие слои совершенно плоские и однородные. Они особенно полезны для препаративных целей, поскольку после опрыскивания пластинки с двух сторон обнаруживающим реактивом и разметки положения полос поверхность пленку, содержащую реактив для обнаружения, можно соскрести и, та-

ким образом, избежать загрязнения элюатов. Хроматографирование проводят в специальных резервуарах, в которых слои расположены не наклонно, а вертикально, чтобы обеспечить равномерное элюирование по сечению слоя; в таких резервуарах объем парового пространства меньше, чем в резервуарах обычного типа. На рис. 10.7 и 10.8 показано разделение некоторых красителей описанным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller J. M., Kirchner J. G., *Anal. Chem.*, **23**, 428 (1951).
2. Balogh B., *Anal. Chem.*, **36**, 2498 (1964).
3. Gogroef G., *Pharmazie*, **12**, 38 (1957).
4. Hayward L. D., Kitchen R. A., Livingstone D. J., *Can. J. Chem.*, **40**, 434 (1962).
5. Balogh B., *Anal. Chem.*, **36**, 2498 (1964).
6. Miller J. M., Kirchner J. G., *Anal. Chem.*, **24**, 1480 (1952).
7. Dahn H., Fuchs H., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 261 (1962).
8. Ritter F. J., Meyer G. M., *Nature*, **193**, 941 (1962).
9. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1409 (1962).
10. Korzun B. P., Dorfman L., Brody S. M., *Anal. Chem.*, **35**, 950 (1963).
11. Mistryukov E. A., *J. Chromatogr.*, **9**, 311 (1962).
12. Clěrný, Joska J., Lábler L., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 1658 (1961).
13. Horobin R. W., *J. Chromatogr.*, **37**, 354 (1968).
14. Johansson L., Kashemsants S., *J. Chromatogr.*, **45**, 473 (1969).
15. Van Arx E., *J. Chromatogr.*, **64**, 297 (1972).
16. Jordan D. M., *J. Chromatogr.*, **57**, 427 (1971).
17. Jordan D. M., *J. Chromatogr.*, **63**, 442 (1971).
18. Kalis V., Karsakevich A. S., Kirsteins A., *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis Kim. Ser.*, **1967**, 572.
19. Clark G. W., *J. Chromatogr.*, **34**, 262 (1968).
20. Brendel K., Steele R. S., Davidson E. A., *J. Chromatogr.*, **30**, 232 (1967).
21. Stutz M., Ludemann W. D., Sass S., *Anal. Chem.*, **40**, 258 (1968).
22. Visser R., *Anal. Chem. Acta*, **38**, 157 (1967).
23. Bockemueller W., Kaiser P., *J. Chromatogr.*, **18**, 86 (1965).
24. Affonso A., *J. Chromatogr.*, **21**, 332 (1966).
25. Affonso A., *J. Chromatogr.*, **22**, 452 (1966).
26. Affonso A., *J. Chromatogr.*, **27**, 324 (1967).
27. Connolly J. P., Flanagan P. J., Dorchai R. O., Thompson J. B., *J. Chromatogr.*, **15**, 105 (1964).
28. Halpaap H., *Chem.-Ing.-Tech.*, **35**, 488 (1963).
29. de Zeeuw R. A., Wijsbeek J., *Anal. Chem.*, **42**, 90 (1970).
30. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., *Anal. Chem.*, **23**, 420 (1951).
31. Schulze P. E., Wenzel M., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1**, 580 (1962).
32. Campaigne E., Georgiadis M., *J. Org. Chem.*, **28**, 1044 (1963).
33. Gritter R. J., Alberts R. J., *J. Chromatogr.*, **9**, 392 (1962).
34. Malins D. C., Mangold H. K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 576 (1960).

35. *Nichaman Z., Sweeley C. C., Oldham N. M., Olson R. E.*, J. Lipid Res, 4, 484 (1963).
36. *Dobiasova M.*, J. Lipid Res, 4, 481 (1963).
37. *Mottier M., Potterat M.*, Anal. Chim. Acta, 13, 46 (1955).
38. *Beroza M., McGovern T. P.*, Chemist-Analyst, 52, 82 (1963)
39. *Janák J.*, Nature, 195, 696 (1962).
40. *Millett M. A., Moore W. E., Saeman J. F.*, Anal. Chem., 36, 491 (1964).
41. *Goldrick B., Hirsch J.*, J. Lipid Res, 4, 482 (1963).
42. *Hansson J.*, Explosivstoffe, 10, 73 (1963).
43. *Matthews J. S., Pereda-V. A. L., Aguilera-P. A.*, J. Chromatogr., 9, 331 (1962).
44. *Mottier M.*, Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 49, 454 (1958).
45. *Hay G. W., Lewis B. A., Smith F.*, J. Chromatogr., 11, 479 (1963).
46. *Spikner J. E., Towne J. C.*, Chemist-Analyst, 52, 50 (1963).
47. *Kirchner J. G.*, J. Chromatogr., 63, 45 (1971).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

На результаты количественного определения, проведенного методом ТСХ, может влиять ряд факторов [1], а некоторые параметры оказывают влияние на результаты вне зависимости от метода определения — будь-то денситометрия, флуориметрия, экстракционный или какой-либо другой метод. Важный фактор и возможный источник больших ошибок — это способ нанесения пробы на тонкий слой. Одна из причин ошибок — втягивание пробы обратно в кончик иглы шприца [2—4]; часть капли втягивается в иглу, и в результате после падения капли в ней остается различное количество пробы. Испарение растворителя приводит к концентрированию оставшегося раствора; последующая капля смывает его, и в результате концентрация раствора существенно увеличивается. Ошибки, связанные с таким способом нанесения пробы, можно свести к минимуму, используя иглу по возможности с тонким кончиком и смазывая его силиконом [4]. Семюэлс [5] рекомендует изменить форму иглы микрошприца путем шлифовки обратной стороны, чтобы игла была направлена в центр, а не вбок.

Когда тонкий кончик иглы касается слоя адсорбента, из шприца под действием сил капиллярного притяжения вытягивается дополнительное количество раствора, что также приводит к ошибкам. Устройства типа Chromatocharger и Linomat (фирма SAMAG) и Chromatoplot (фирма Burkard Scientific) выбрасывают капли, что устраняет обе эти проблемы.

С помощью группы студентов Брейн [6] исследовал «эффект оператора» в операции нанесения проб в количественных исследованиях.

Для нанесения проб на пластинки, которое проводилось в самых разных условиях, Брейн и сотрудники использовали капилляр, отрезанный так, чтобы в нем удерживался заданный объем раствора (Мигосар, фирма Gilmpond), и устройство на основе шприца Гамильтона для многократного ввода пробы.

Проведенные исследования показали, что ошибки, допускаемые операторами, могут быть самыми разными. Лучшие результаты были получены с устройством для многократного ввода. Среднее отклонение результатов у необученных операторов

ров составило 5,6 %, а у обученных операторов — только 3,5 %. В то же время при вводе пробы с помощью капилляра среднее отклонение составило 9,5 % при диапазоне отклонения от 1,2 до 53,4 %. Все попытки уменьшить ошибки при таком способе ввода, в частности: а) ополаскивание микропипетки, б) подача пробы в пять приемов вместо одного или в) выталкивание пробы из капилляра с помощью резиновой груши, приводили только к увеличению ошибок. Фэбарнс и Рельф [4] исследовали «эффект оператора» для группы из 10 обученных операторов, которые наносили пробы, используя различные приборы. Найденное этими авторами отклонение составило ± 25 %.

Величина ошибки зависит также от материала слоя; так, для силикагеля она может составлять 6,8 %, а для полиэтиленминцеллюлозы достигать 13,7 % [6].

Суммируя результаты своей работы, Брейн пишет: «Важно, чтобы любой исследователь, которому требуется осуществить количественное нанесение пробы, сам тщательно проверил ошибки, связанные с нанесением проб в заданных экспериментальных условиях, а не просто принимал на веру цифры, принятые другими исследователями».

Пятно пробы должно быть предельно малым и не перегруженным, иначе возможно образование хроматографических полос. При нанесении пробы в несколько приемов важно также, чтобы объем, наносимый за один раз, был постоянным, так чтобы площадь пятен была одинаковой [6а]. Очень большое внимание следует уделить тому, чтобы не нарушить целостности поверхности слоя, поскольку это приводит к искажению формы пятна [7].

Чтобы избежать ошибок, связанных с нанесением проб, Клаус [8] использовал внутренний стандарт.

Далее мы рассмотрим колебания результатов при переходе от одной пластинки к другой. В табл. 11.1 показано, что отклонения между пятнами, измеренными на одной и той же пластинке, меньше, чем отклонения между пятнами, измеренными на различных пластинках. Ошибки подобного рода можно свести до минимума, проводя опыты с двумя стандартами на каждой пластинке. В этом случае можно проверить линейность регрессионной связи между количеством измеренного вещества в конечном пятне и количеством нанесенного вещества.

Конечно, элюирование нужно проводить одним и тем же растворителем и в одинаковых условиях, чтобы избежать даже незначительных изменений условий, которые могут оказать влияние на результаты. Самым лучшим растворителем для количественного определения считается однокомпонентный растворитель, который дает значения R_f в пределах от 0,25 до 0,75 [10].

Таблица 11.1

Воспроизводимость сканирования различных пятен на одной и той же и на различных хроматограммах [9]^а

Соединение	На одной и той же хроматограмме		На различных хроматограммах	
	Площадь пика, мм ² Среднее значение (n=6)	s, %	Площадь пика, мм ² Среднее значение (n=6)	s, %
ФТН-пролин ^в	2300	5,8	1820	11,9
ДФ-пролин ^г	2080	7,4	2400	8,6
ДФ-пролин ^д	640	4,4	630	5,4
ДАНС-пролин ^е	1550	3	1710	9,1
ДАНС-пролин ^ж	2045	6,2	2640	14,4

^а С разрешения авторов и фирмы Friedrich Vieweg and Sohn GmbH.

^б Время выдержки между сушкой и сканированием в каждом случае нормировано.

^в 2 мкг; тушение (силикагель F).

^г 2 мкг; тушение (силикагель).

^д 2 мкг; отражение (силикагель).

^е 2 мкг; флуоресценция (силикагель).

^ж 2 мкг; флуоресценция (силикагель) после опрыскивания смесью триэтанолмин—изопропанол (1 : 4).

Затруднения могут возникнуть из-за загрязнений, группирующихся вблизи фронта при слишком высоких значениях R_f . Не следует также забывать, что чем больше R_f , тем выше диффузия пробы. Смешанные растворители в процессе хроматографирования могут разделиться, и если соединение перемещается с β -фронтом, то при этом будет происходить латеральная диффузия пятна, что приведет к снижению точности результатов [11]. В этом случае загрязнения адсорбента также могут увлекаться β -фронтом.

Теоретические вопросы количественной ТСХ рассматривают Гримм [12], Боултон и Поллак [13—17], Клаус [18], Зайлер и Мёллер [19, 20] и Голдман и Гудал [21—23]. Кайзер [24—27] провел убедительное, хорошо аргументированное обсуждение расчетов ошибок в количественном анализе, а Поллак и Боултон [28] дали математическую обработку влияния нелинейности при оптическом сканировании. Количественной ТСХ посвящены две книги [28а, 28б].

1. ЭКСТРАКЦИОННЫЕ МЕТОДЫ

Первые количественные исследования по ТСХ развивались на основе экстракционного метода ввиду того, что аналитические методы были уже в то время доступны для соединений в растворах, но еще не были разработаны методика и приборы для прямого анализа методом ТСХ.

Чтобы результаты анализа были удовлетворительными, необходимо решить ряд вопросов.

1. Искомый компонент необходимо четко отделить на хроматограмме от мешающих определению веществ.
2. Чтобы можно было ввести поправку на потери, материал должен полностью извлекаться из адсорбента или должна извлекаться большая его часть.
3. Адсорбент следует проверить на наличие веществ, мешающих определению, и удалить их до начала анализа.
4. Хроматографические зоны следует обнаруживать с помощью веществ, не мешающих определению.
5. Чтобы проверить пригодность анализа, следует провести опыты со стандартными пробами.

Предложен ряд методов для уменьшения количества примесей, попадающих в конечный элюат из адсорбента. Малдер и Венстра [29] наносили пробы в виде полос и проводили непрерывное горизонтальное хроматографирование с тем, чтобы разделить соединения и переместить полосы к верхнему краю пластинки для концентрирования путем упаривания. В гл. V указан ряд методов, применяемых для такого хроматографирования. После этого пластинки поворачивают боком и, используя узкие полоски бумаги, с помощью которых растворитель направляют на необходимую часть хроматограммы, концентрируют полосы в виде пятен. Де Дейн и Феттерс [30] пользовались другой методикой. После достижения необходимой степени разделения пятен они поворачивали пластинки на 90° и удаляли адсорбент над пятном. Небольшие кусочки беззольной фильтровальной бумаги, которым придавали форму пятен, помещали рядом с пятнами и прижимали стеклянной пластинкой.

Края бумаги загибали в сторону, противоположную стеклянной подложке. Далее, проводя горизонтальное хроматографирование в другом направлении и направляя с помощью бумажного мостика растворитель на оставшуюся часть адсорбента, пятна выводили на края бумаги. После чего довольно просто проэкстрагировать соединение из бумаги. Возможен и другой метод. Адсорбент помещают над пятном в точке, где продукты

могут концентрироваться. Дополнительные способы удаления мелких частиц силикагеля из элюатов см. в гл. XII.

Содержащееся в силикагеле железо может мешать определению, особенно при применении колориметрических методов. Его можно удалить и перед приготовлением слоев, как описано в гл. III, и с уже покрытых пластинок. В последнем случае проводят предварительное проявление смесью метанол—концентрированная соляная кислота (9:1) с последующей сушкой и реактивацией слоя.

Извлечение материала из адсорбента редко бывает 100%ным, но Эберли и др. [31] сумел увеличить степень извлечения пестицидов из слоев силикагеля от 45—55% при обычной экстракции до 85—95%, подвергая суспензию силикагель-растворитель ультразвуковому облучению.

Потери в процессе хроматографирования и извлечения можно учесть, подвергая стандартные растворы различной концентрации таким же операциям, которые проводятся и над анализируемыми пробами. Можно построить кривую зависимости количества введенной пробы от результатов, полученных при анализе.

При соскребывании пятен с пластинки возможны потери адсорбента, поэтому Хастингс и Вонг [32] соскребали адсорбент вокруг пятна, смачивали пятно водой и помещали пластинку в морозильную камеру. После такой обработки пятно можно удалить с пластинки как одно целое. Турчинский и Шершнева [33] применяли подобную методику, но фиксировали пятна раствором нитроцеллюлозы. Если по какой-либо причине соскребывание адсорбента нежелательно, можно осуществить извлечение непосредственно на пластине. Для этой цели предназначен специальный прибор «Eluchrom» (см. рис. 5.12), сконструированный Фальком и Крумоном [33a] и выпускаемый в продажу фирмой SAMAG (см. разд. автоматизации в гл. V).

Обзор по количественной ТСХ опубликован в 1968 г. Куртом [34].

Спектрофотометрические методы

В 1954 г. Кирхнер и др. [35] первыми применили ТСХ для количественного анализа. Этим методом они определяли дифенил в плодах цитрусовых и изготавливаемых из них продуктах. Эта работа была проведена для того, чтобы показать, что ТСХ можно использовать как аналитический метод и что если условия определения тщательно стандартизованы, то надежность метода достаточна. Чтобы предохранить плоды цитрусовых от заплесневения при перевозке по морю и хранении, упаковочный материал обрабатывают дифенилом, поэтому очень важно

располагать методом, позволяющим определить количество паров дифенила, адсорбированных плодами. Поскольку концентрация дифенила в соке цитрусовых мала, необходимо концентрировать дифенил в продукте. С этой целью суспензию фруктов в воде перегоняют в усовершенствованном приборе «Clevenger» [36]. При перегонке дифенил и цитрусовые масла собирают в небольшом объеме гептана, который осторожно переводят в мерную колбу и доводят до стандартного объема. В качестве подложки для тонких слоев были выбраны стеклянные полосы размером 13×136 мм, равномерность толщины которых проверялась микрометром. Слой кремневой кислоты, содержащие связующее (крахмал) и флуоресцирующие добавки (сульфид цинка-кадмия и силикат цинка), наносят вручную шпателем, используя направляющие для регулирования толщины слоя. Имеющееся в продаже устройство для нанесения слоя не обеспечивает удовлетворительного качества последнего, поскольку даже небольшие колебания в толщине слоя вызывают колебания фонового поглощения. Содержание фоновых примесей, поглощающих в УФ-области, уменьшают, проводя предварительное элюирование активированных полос 95 %-ным этанолом, который смещает эти примеси к верхнему краю полоски. После обработки этанолом полоски сушат 4 мин при 85 °С в печи с принудительной циркуляцией воздуха и охлаждают в эксикаторе. Пробы наносят на хроматографическую полоску с помощью дозирующего микрошприца [37], позволяющего наносить 0,1 мкл раствора. (Это устройство поставляется отделом снабжения главной лаборатории.) Чтобы избежать потерь, обусловленных испарением, стеклянные соединения колпачка иглы и поршня шприца покрывают водорастворимой смазкой [38]. Полосы элюируют на расстоянии 10 см очищенным петролейным эфиром (т. кип. 30—60 °С), в котором R_f дифенила равно 0,45, что обеспечивает хорошее отделение дифенила от углеводов цитрусового масла, движущихся вблизи фронта растворителя. Дифенил, проявляющийся в УФ-свете в виде темного пятна на флуоресцирующей полосе, маркируют, соскребают шпателем площадку адсорбента длиной 22 мм и шириной, равной ширине полосы, с пятном дифенила в центре и помещают в воронку с пористым стеклянным фильтром. Дифенил элюируют непосредственно в 3-миллилитровые мерные колбы 95 %-ным спиртом, доводят объем раствора до метки и измеряют поглощение на спектрофотометре в области 248 нм. В показании вносят поправку, учитывая средние данные нескольких холостых опытов; количество дифенила определяют по исправленным значениям плотности и по стандартной кривой, показанной на рис. 11.1. Эту стандартную кривую строят по данным, полученным для различных проб плодов, в которые предварительно добавляют

известное количество дифенила. Таким образом, при построении кривой учитывается фактическое извлечение дифенила. Результаты анализа оказались удовлетворительными при содержании дифенила до $0,1 \cdot 10^{-4} \%$ в соке и $6 \cdot 10^{-2} \%$ в кожице плодов. Средняя ошибка 57 анализов составила $\pm 2,8 \%$ при максималь-

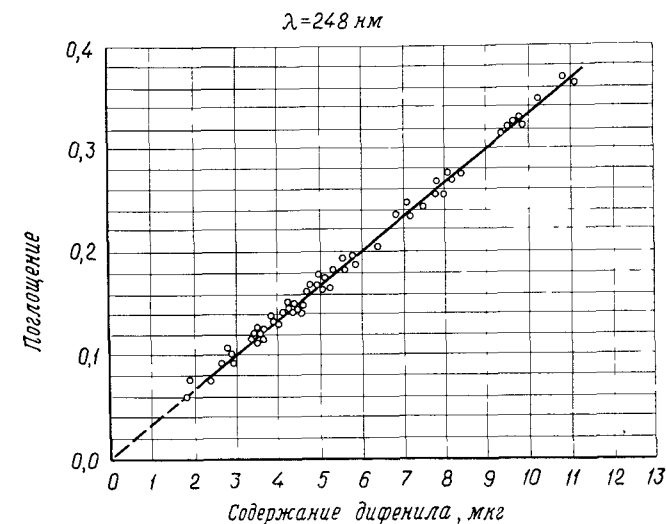


Рис. 11.1. Спектрофотометрическая стандартная кривая для определения дифенила методом ТСХ ($\lambda = 248 \text{ нм}$; 10-миллиметровая ячейка) [35] (с разрешения Am. Chem. Soc.).

ной ошибке 9,3 %. Только в 7 из 57 опытов ошибка превысила 5 %. Стенли и др. [39] применяли эту методику, несколько видоизменив ее, а Бакстер [40] сравнил этот метод с химическим методом определения дифенила.

Даже при использовании предварительно промытых адсорбентов в холостых растворах можно обнаружить примеси, мешающие спектрофотометрическому определению соединений. Точность анализа можно улучшить, проводя холостые опыты [35]. Харрис и др. [41] обнаружили, что воспроизводимость результатов холостых опытов выше, если после завершения хроматографирования соскабливать с пластинки не участки одинаковой площади, а такие участки, которые дают одинаковые массы. Другой метод уменьшения адсорбции, связанный с загрязнением, попадающими из адсорбента, заключается в том, чтобы перевести искомый компонент в окрашенный комплекс и измерять его поглощение в видимой области, поскольку

адсорбированные примеси обычно поглощают в области от 200 до 300 нм.

Бёрниг и Райнике [42] и Коффи и Ньюбур [43] определяли нуклеотиды прямым спектрофотометрическим методом. Разделение они проводили на слоях DEAE-целлюлозы. Все вещества, поглощающие в УФ-области, удаляли из адсорбента промывкой; для этого 10 г DEAE-целлюлозы перемешивали 4 раза по 30 мин в 250 мл 1 н. соляной кислоты, после чего кислоту отфильтровывали и целлюлозу промывали до удаления следов кислоты. Обработанную таким образом целлюлозу наносят на пластинки обычным методом. Коффи и Ньюбур нашли, что 10 % сульфата кальция, добавленного в качестве связующего, так меняют адсорбционные свойства, что при разделении дезоксирибонуклеотидов лучшим растворителем оказывается изобутират аммония. В то же время на слоях, лишенных сульфата кальция, соляная кислота обеспечивает лучшее разделение. Бёрниг и Райнике показали, однако, что концентрация соляной кислоты оказывает существенное влияние, так как в одном случае обработка 0,022 н. соляной кислотой приводит к плохому разделению, в то время как 0,025 н. соляная кислота дает хорошее разделение. Каждую партию пластинок следует испытывать отдельно, чтобы установить оптимальную концентрацию соляной кислоты. После того как хроматограммы высушены до такого состояния, когда адсорбент еще остается немного влажным, зоны удаляют и экстрагируют 1 М раствором хлорида натрия; в это же время холостую пробу целлюлозы элюируют с отдельной полосы. Элюат фильтруют через фильтр G-4 (с пористой стеклянной пластинкой) и измеряют поглощение в области 260 мкм.

Вайнер и Зак [44] применили прямой спектрофотометрический анализ элюатов после электрофореза нуклеотидов на агаровом геле.

Прямое спектрофотометрическое определение элюатов после разделения методом ТСХ было проведено при анализе углеводов [45—48], пищевых красок [49, 50], карбонильных соединений [51, 53], хинонов [54], пестицидов [39, 55—58], кислот [59—61], гликозидов [61—64], антибиотиков [65—67], лекарственных препаратов [68—72], пигментов [73—75], витаминов [76—80], алкалоидов [81—85], взрывчатых веществ [86], терпенов [87—89], сложных эфиров [90], антиферментов в пище [91], 2,4-динитрофенилгидразонов [51—53, 92—94], стероидов [95—97], липидов [98—100], пентахлорфенолов [101], аминокислот [102—103], производных индола [104], аминов [105], нитросоединений [106], нитрозаминов [107], нуклеотидов и олигонуклеотидов [108—110], желчных кислот [111] и фенолов [112].

Колориметрические методы

При определении соединений колориметрическими методами полученные после хроматографического разделения элюаты обрабатывают соответствующим образом с тем, чтобы получить окрашенный раствор, и далее измеряют поглощение полученного соединения на колориметре или спектрофотометре, если требуется исследовать узкую область длин волн.

Здесь справедливы те же общие законы, что и при спектрофотометрических определениях. В качестве примера рассмотрим обнаружение О,О-диметилдитиофосфорилфенилацетата [113] и сигона (О,О-диметил-S-(N-метилкарбамоилметил)фосфодитионат) [114] и соответствующих кислородных остатков аналогов путем окисления хлорной и азотной кислотами и последующего определения фосфора методом молибденовой сини. Диметоат (общее название) представляет собой органический фосфатный инсектицид, и аналитический метод должен обеспечить определение не только материнского вещества, но и растительного метаболического кислородного аналога (О,О-диметил-S-(N-метилкарбамоилметил)фосфотионат).

Для этого определения стеклянные пластинки размером 5×20 см покрывают обычным методом смесью силикагеля G и силикагеля HF (1:1); толщина слоя должна составлять 0,5 мм. Пластинки сушат 12 ч при комнатной температуре, после чего подвергают предварительной промывке ацетоном.

Пробу получают следующим образом: вымачивают 100 г растительной ткани, далее тщательно экстрагируют ее ацетоном, который после этого из экстракта удаляют при 25°C. Остаток тщательно экстрагируют гексаном, чтобы удалить растительные воски. При экстрагировании гексаном вначале не следует слишком интенсивно встряхивать смесь, так как при этом может образоваться эмульсия. Водную фазу после этого насыщают сульфатом натрия и экстрагируют хлороформом. Конечный экстракт упаривают до 100—200 мкл и затем уже наносят на тонкослойные пластинки. Разделение проводят смесью ацетон—хлороформ (75:25) в камере, атмосфера которой насыщена парами этих веществ. После разделения хроматограмму сушат при комнатной температуре и опрыскивают спиртовым раствором хлорида палладия. После 12-часовой выдержки полосы соскребают в воронки с пористым стеклянным фильтром, где проводят элюирование 1 н. раствором азотной кислоты. Пробы затем окисляют 70 %-ной хлорной кислотой (работать с этой кислотой нужно очень осторожно). После охлаждения и разбавления проводят обнаружение, обрабатывая хроматограмму молибдатом аммония и реактивом Фиске—Субвароу в кислой

среде. Поглощение измеряют при 820 нм, вводя поправку на холостой опыт. Калибровочные кривые строят по данным, полученным для стандартных растворов диметаноата и его кислородного аналога. Авторы методики полагают, что после небольшой модификации ее можно использовать для определения других фосфорорганических соединений.

Хойсер [115] определял стандартное отклонение для ряда колориметрических методов и нашел, что оно колеблется в пределах от $\pm 1,2$ до $\pm 4,2$ %.

Колориметрические методы в ТСХ использовали для анализа аминокислот и белков [116], пестицидов [57, 114], гликозидов [61, 117], витаминов [76, 118—120], лекарственных препаратов [121—123], терпенов [124], фенолов [125—127], алкалоидов [128—130], спиртов [131—132], углеводов [133—135], липидов [136—143], кислот [144], антиоксидантов [145, 146], стероидов [96, 147—153] и карденолидов [154].

Флуориметрические методы

Брюинвельс [155] провел указанным методом определение альдостерона, гидрокортизона и кортикостерона на силикагеле, содержащем 3 % флуоресцентного лекарственного вещества (S. 5. Gruent/1 5319157, Leuchtstoffwerk). Нанесенную на пластинку пробу разделяли в течение 1 ч методом восходящей хроматографии 8 %-ным раствором (96 %) этанола в хлороформе в закрытой камере при 38,5°C. Пятна, видимые в УФ-свете, переносили в центрифужные пробирки. Пятно альдостерона смешивали с 1 мл концентрированной серной кислоты и выдерживали 1 ч. После отделения силикагеля путем центрифугирования раствор нагревали 1 ч при 100°C, охлаждали и измеряли флуоресценцию. Гидрокортизон и кортикостерон элюировали смесью этанола с серной кислотой. Степень извлечения составляла $95 \pm 3,4$ %. Этим методом можно определять от 0,5 до 4 мкг вещества.

Мёллер и Хонерлаген [156] и Брекман и др. [157] определяли флуориметрическим методом хинин и хинидин в коре хинного дерева.

Ванье и Стенли [158] объединили нисходящую хроматографию на слоях силикагеля с методом измерения флуоресценции 7-гераноксикумарина в щелочном растворе для определения 0,5 % масла грейпфрута в лимонном масле. 7-Гераноксикумарин содержится в масле грейпфрута, но в обычном лимонном масле отсутствует.

Савицкий и др. [46] применили флуориметрический метод для анализа бензо- α -пирена в веществах, загрязняющих атмо-

сферу; Генест и Фармило [159] определяли этим методом диэтиламид лизергиновой кислоты в наркотических препаратах, а Кутачек и Прохазка [160] — производные индола в крестоцветнике (*Cruciferae*).

Флуориметрическое детектирование после выделения использовалось при анализе желчных кислот [161], аминопроизводных катехина [162], углеводов [163], порфиринов [164, 165].

Гравиметрический анализ

Этим методом проведен прямой анализ липидов [166—169], пестицидов [170], алкалоидов [171, 172], пластификаторов [173], моющих веществ [173а] и стероидов [173б]. Область применения этого метода несколько ограничена, что, по-видимому, обусловлено его спецификой. Так, при проведении гравиметрического определения очень сложно определить поправку на холостой опыт, кроме того, количество вещества, приходящееся на отдельное пятно, мало.

Объемный анализ

Этим методом осуществлен ряд анализов элюатов ТСХ. Васикова и др. [174] выделяли из зон свободные жирные кислоты и анализировали их титрованием. Фосфолипиды и триглицериды гидролизвали, а образовавшиеся жирные кислоты титровали. Икрам и Бакш [175] определяли алкалоиды листьев и корней *Datura alba*, проводя сначала хроматографирование на незакрепленном слое оксида алюминия и затем элюируя хлороформом пятно тропана. После удаления растворителя остаток растворяли в 0,01 н. серной кислоте и проводили обратное титрование стандартным раствором гидроксида натрия. При содержании алкалоидов от 0,2 до 1,3 мг ошибка определения составляет 0—2 %. Пастушка [176] разделял сахара на слоях силикагеля и определял их титрованием. Пятна соскребали в колбочки и нагревали 60 мин на водяной бане при 95°C с двукратным избытком раствора бихромата калия. Из соответствующего слоя адсорбента на высоте пятна сахара отбирали холостую пробу. После охлаждения к бихроматному экстракту добавляли 20 мл воды и 5 мл 5 %-ного иодата калия. Выделившийся иод титровали 0,01 н. раствором тиосульфата с крахмальным индикатором. Добичи и Грасини [177] также титровали периодат и иодат после разделения на слоях алебастра раствором тиосульфата. Методы и титрованные

растворы рассчитаны на автоматическое кондуктометрическое титрование. Для титрования пятен *in situ* разработана [177a] небольшая ячейка для измерения электропроводности.

Потенциометрическое титрование применяли для анализа стероидов [178], оловосодержащих стабилизаторов [179], фармацевтических препаратов [180] и неорганических соединений [181].

Газовая хроматография

Газовую хроматографию (ГХ) можно использовать для количественного определения липидов, разделенных методов ТСХ. Биоке и Холман [138] анализировали методом ГХ эфиры жирных кислот после хроматографирования их на силикагеле G с различными смесями диэтилового эфира и гексана. Зоны затем элюировали диэтиловым эфиром, объем полученного раствора доводили до определенной величины, отбирали аликвотную часть его и вводили в газовый хроматограф. Бойер и др. [182, 183] таким же методом определяли липиды крови, но сначала эти авторы экстрагировали примерно 5 мг липидов из крови и наносили пробу на слой кремневой кислоты. После разделения пятна обрабатывали 10 %-ной серной кислотой (масса/объем) и этерифицировали, добавляя безводный метанол и нагревая 1 ч при 80 °С (сфингомиэлин нагревали 16 ч). К смеси на этой стадии добавляли кристалл гидрохинона, выполняющий роль антиоксиданта. После метилирования к пробе добавляли воду и экстрагировали сложные эфиры петролевым эфиром (40—60 °С). Экстракт петролевого эфира сушили над смесью безводного сульфата и бикарбоната натрия (4:1), концентрировали и вводили в колонку газового хроматографа. Неподвижной фазой служил полиэфир янтарной кислоты и этиленгликоля. При разделении указанным способом не следует применять для обнаружения иод, поскольку это приводит к частичной потере ненасыщенных кислот [184]. Аналогичным методом анализируют и стероиды [185, 186]. В этом случае триметилсилиловые эфиры можно получить при взаимодействии с гексаметилдисилазаном. Описанным способом в суточной пробе мочи определили 15 мкг тестостерона с точностью $\pm 7\%$ [185].

Хофсоммер [187] использовал газовый хроматограф с ^{63}Ni электронно-захватным детектором для определения микро- и пикограммовых количеств нитросоединений, элюированных с тонкослойной пластинки.

Из приведенных примеров следует, что достаточно летучие соединения можно извлечь и ввести непосредственно в газовый

хроматограф для количественного определения. Менее летучие соединения следует перевести в соответствующие летучие производные*.

Полярографические методы

Полярографические методы определения применяли к ряду элюатов, полученных с тонкослойных хроматограмм, в частности элюатов лекарственных препаратов [188], пестицидов [189, 189a] и нитросоединений [190]. Ошибки определения лежат в пределах от ± 1 до 5 %. Кутачек и Прохазка [160] использовали осциллополярграфический метод для определения глукобрассидина — индольного производного, содержащегося в *Sisyrinchia*. Хубер [191] нашел, что катоднолучевая полярография повышает чувствительность определения на 1—2 порядка по сравнению со спектрометрическим методом и, кроме того, позволяет обойтись без поправки на холостой опыт. Автор приводит три примера: определение гидрофобного соединения, гидрофильного соединения и гидрофильного соединения, которое переведено в полярографически активное производное. Запатентованный полярографический электрод позволяет осуществить прямое определение на слое без элюирования пятна [191a].

2. ПРЯМЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

Измерения, проводимые непосредственно на хроматографических пластинках, характеризуются рядом преимуществ.

* Наиболее распространенные оптические методы имеют ряд существенных недостатков, а именно ограниченную селективность, недостаточную чувствительность к некоторым типам соединений и т. д. В связи с этим необходимо отметить вариант количественной ТСХ, основанной на сочетании ТСХ и реакционной газовой хроматографии. Хроматографическую зону вещества удаляют вместе с сорбентом с пластинки и переносят в реактор, где в результате реакции разделенного компонента с реагентом образуются летучие продукты, количество и природу которых определяют газохроматографическим методом [Franc J., Senkyřova J., *J. Chromatography*, 78, 123 (1973)]. На примере анализа кремнийорганических соединений было показано, что ошибка определения вышеописанным методом не превышает ошибки денситометрического определения.

Соединение газовой и тонкослойной хроматографии позволяет использовать преимущества обоих методов (Методы-спутники в газовой хроматографии. Пер. с англ./Под ред. Л. С. Эттре, У. Мак-Фаддена.— М., Мир, 1972, с. 324). Использование этого комбинированного метода представляет интерес для проведения как качественного, так и количественного анализа. Яркий пример реализации этого метода при анализе эфиров непредельных жирных кислот C_{14} — C_{22} описан в работе: Krupčík J., Hřivnák J., Janek J., *J. Chromatogr. Sci.*, 14, 4 (1976).— *Прим. ред.*

В частности, при таком способе измерения меньше потери, меньше затраты времени и, наконец, возможно определение меньших количеств. Во всех вариантах прямых измерений желательнее предварительно просканировать пластинки для ТСХ и применять для количественной работы наиболее однородные из них.

Прямая флуориметрия

Если при облучении светом заданной длины волны вещество флуоресцирует, то по количеству излученного света можно оценить количество определяемого компонента. Поскольку луч не проходит через адсорбент и стеклянную подложку, обусловленные потери значительно меньше, чем при прямой денситометрии. Однако измерять флуоресценцию можно и с обратной стороны пластинки. Естественно, что измерения с освещенной стороны дают больше света. На измерения флуоресценции оптический фон оказывает меньшее влияние, чем при измерении поглощения света [192].

Прямое измерение флуоресценции — более чувствительный метод, чем измерения плотности отражения, поэтому в первом случае можно определять не только микро-, но и нанограммовые количества. Варга и Ричардс [193] определяли флуоресцентный сканированием пикомолярные количества аминокислот. Рипфан и др. [194] применяли силикагель с порами размером 60 Å для высокоэффективной ТСХ при разделении от 10 пг до 100 нг флуоресцирующих соединений.

Существует ряд факторов, оказывающих влияние на флуоресцентный анализ; например, с изменением длины волны возбуждающего излучения может нарушиться линейная зависимость между величиной пятна и количеством вещества [195]. Поэтому важно убедиться, что использовавшаяся длина волны возбуждающего света вызывает флуоресценцию с линейной характеристикой. В то же время преимущество флуориметрии заключается в том, что в этом случае диапазон концентрации, в котором сигнал почти линеен, значительно шире [192].

Применяемый адсорбент оказывает влияние на интенсивность флуоресценции. Так, например, обнаружено, что слои полиамида дают более высокую интенсивность флуоресценции, чем слои силикагеля [196]. Содержание влаги в слое также влияет на интенсивность флуоресценции. Этот эффект можно уменьшить, если работать строго по прописи, а также опрыскивать пластинку смесью триэаноламин — изопропанол (1:4) [197, 198].

Смит [199] предложил метод индуцирования флуоресценции в большом числе различных соединений. С этой целью

в суспензию 30 г силикагеля в 60 мл воды вводят 1,5 г сульфата аммония. После разделения пластинку сушат и помещают на 15 мин в камеру, атмосфера в которой насыщена парами *трет*-бутилгипохлорита. По окончании выдержки пластинки нагревают 15 мин при температуре от 150 до 180°C в зависимости от природы анализируемого соединения. Авторы работы [200] предлагают обрабатывать аналогичным способом слои, приготовленные обычным образом. После элюирования и сушки слои нагревали при 110—150°C в закрытой камере с бикарбонатом или гидроксидом аммония. Для количественных определений на тонких слоях применяли рентгеновскую флуоресцентную спектрометрию. Разработано сканирующее устройство [201] для рентгеновского спектрометра, опробованное на различных соединениях фосфора, серы и галогенов, обеспечивающее специфическое обнаружение отдельных элементов с пределом обнаружения около 2 мкг. Либби [202], пользуясь этой методикой, исследовал фосфаты, фосфолипиды, бромсалициламиды и серо-содержащие органические соединения и описал три метода калибровки. Рентгеновскую флуоресценцию применяли для определения фосфолипидов [203] и пестицидов [204].

Эбель и Герольд [205] описали установку, в которой программный настольный калькулятор непосредственно соединен с флуориметрическим устройством для измерений пластинок ТСХ.

Коннорс и Боак [206] наносили адсорбент на гибкую подложку с тем, чтобы слои можно было изгибать и надевать на вращающийся барабан флуориметра фирмы Turner, модель III (G. K. Turner Associates). Подложку нарезали (5×20 см) из ленты нержавеющей стали толщиной 0,1 мм, идущей на прокладку; ленту с одной стороны делали шероховатой с помощью вспомогательной ткани, чтобы тонкие пластинки не скользили по поверхности. Использовали два вида слоев: 1) смесь 18 г силикагеля G с 27 г целита (Johns/Manville) и 2) порошок целлюлозы с сульфатом кальция в качестве связующего. Слои первого вида предпочтительны, поскольку фон флуоресценции у них ниже.

Этим методом определяли сахара, разделенные смесями этилацетат — пиридин — вода (2:1:2) или *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:2). После разделения хроматограммы сушили на воздухе и опрыскивали спиртовым раствором *n*-аминогиппуровой кислоты [207]. Флуоресцирующие соединения обнаруживались после 8-минутного нагревания при 140°C.

При проведении измерений хроматографические пластинки укрепляли на барабане с помощью маскировочной ленты. Для сканирования через каждые 0,5 см использовали прямоуголь-

ную щель (3×25 мм), устанавливая прибор на нуль в холостой зоне хроматограммы. Стандартные калибровочные кривые снимали для рабочего диапазона от 1 до 20 мкг.

Тушение флуоресценции

При тушении флуоресценции слои превращают во флуоресцирующие, вводя соответствующий реактив [208]. Можно также измерять соединения, поглощающие в УФ-свете, но не излучающие света. Поскольку при тушении и при измерении флуоресценции используется только часть толщины пятна, важно, чтобы пятна имели нужные размеры и чтобы пробы были нанесены соответствующим образом [209].

Отражательная спектроскопия

Со времени выхода в свет первого издания этой книги применение отражательной спектроскопии существенно расширилось благодаря усовершенствованию аппаратуры и методики.

В этом методе часть луча, проникающую в слой на некоторую глубину, которая не поглощается или не рассеивается за пределы измерительной системы, измеряют как отраженный свет.

Измерение отражения можно осуществить двумя способами. Согласно одному из них, пятно вместе с некоторым количеством адсорбента (суммарная масса должна быть постоянной) тщательно растирают в ступке и распределяют ровным слоем в чашечке или ячейке [210]. Соответствующий холостой опыт проводят с адсорбентом, обработанным точно так же. Другой метод заключается в измерении отражения непосредственно на слое. Первый метод точнее, но требует больших затрат времени.

При использовании прямых измерений отражения толщина слоя не оказывает такого большого влияния, как при прямой денситометрии; однако пластинки должны быть по возможности однородными, а характеристики их воспроизводимыми. Однородность пластинок можно повысить, пользуясь слоем из частиц адсорбента, близких по размерам. Большое значение имеет концентрация суспензии: при удачно выбранной концентрации легче получить равномерные слои. При проведении измерений рекомендуется подкладывать под пластинку белую подложку [211, 212].

Иорк [213] обнаружил, что чувствительность повышается примерно на порядок при применении тонко измельченного адсорбента с малым диаметром пор. Трайбер и др. [214] нашли, что повышенной чувствительности и воспроизводимости можно достичь, проводя на одном и том же пути одновременные измерения коэффициента поглощения и коэффициента рас-

сеивания; такая методика измерения позволяет добиться постоянства основной линии. Это подтвердили Иорк [215] и Хозель [216]. Указанный способ определения позволяет увеличить пределы обнаружения в 10 или 100 раз, благодаря чему нанogramмовые количества вещества удается измерить с воспроизводимостью $s=5-7\%$. Фрай [212] рекомендует использовать двухлучевой прибор в тех случаях, когда для обнаружения пятен применяют реактивы. При тщательно стандартизованной методике относительные отклонения на одной и той же пластинке составляют от 1,5 до 5,3% [217, 218]. Для различных хроматограмм степень колебаний результатов составляет от 4 до 6% [217].

Для улучшения количественных результатов Ямамото и др. [219] использовали сканирующий метод зигзага в двойной точке длин волн. Такая методика особенно эффективна при измерении пятен неправильной формы или пятен с различной концентрацией.

Ямамото и др. [219] предложили зигзагообразное сканирование импульсами света малого сечения с двумя длинами волн. Одна из длин волн такова, что исследуемое вещество не поглощает данного излучения, но разброс рассеивания при этом такой же, как и при облучении светом другой волны.

Бетке и др. [210] разработали метод «парных данных», позволяющий уменьшить ошибки при измерении отражения. Согласно предложенной этими авторами методике, растворы сравнения и стандартные растворы наносят так, чтобы каждой концентрации соответствовали два пятна, расстояние между которыми было бы равно половине ширины пластинки. Среднюю величину двух промеров в прямом и обратном направлениях принимают за относительное стандартное отклонение, составляющее $\pm 1,5\%$.

Лью и Фродима [221] предложили метод выбора оптимальной концентрации для измерения отражения.

Эбель и Герольд [222] описали последовательную комбинацию из программного настольного устройства с приспособлением для измерения рассеивания. Кинест [223] опубликовал программу ЭВМ для прямого измерения отражения с использованием Olivetty Program 101.

Фрай [224] опубликовал обзор по применению отражательной спектроскопии в ТСХ.

Денситометрия

В прямой денситометрии свет, падающий на пластинку, распределяется различным образом: часть отражается, часть рассеивается, а часть проходит и в большей или меньшей степени

поглощается пробой и адсорбентом. Поэтому слои должны быть однородными и совершенно одинаковыми по толщине. Однородности можно достичь, тщательно перемешивая адсорбционную смесь и не допуская захвата ею пузырьков воздуха.

Чтобы толщина слоя была одинаковой, добавлять воду в смесь адсорбента и связующего следует, как показали Хара и др. [2, 225], очень осторожно. Плотность суспензии должна соответствовать заданной величине, и наносить суспензию следует на сухие пластинки тщательно высушенным аппликатором.

Если пятно пробы обрабатывают окрашивающим реагентом, то следует учитывать некоторые условия окрашенные продукты не должны диффундировать в окружающую среду, а окраска должна быть пропорциональна количеству пробы, должна быть воспроизводимой и устойчивой. Наносить реактив необходимо так, чтобы он распределялся по пластинке равномерно. Уменьшить вероятность появления ошибки, обусловленной неравномерным нанесением реагента, можно, нанося попеременно пятна пробы и стандартные растворы. Грэм и др. [11] показали, что при опрыскивании хромогенным реактивом среднее различие между двумя соседними пятнами составляет 2,5 %, по сравнению с 5,2 % — максимальной ошибкой для всей пластинки.

При проведении измерений следует учитывать ряд факторов. Даллас [226] обнаружил, что сканирование с помощью пятна в 1 мм обеспечивает более постоянные значения площади пика, чем сканирование щелью. Шеллард и Элем [227] предпочитают применять щель. Они показали, что если ширина щели меньше ширины пятна, то колебания меньше, чем в том случае, когда ширина щели больше ширины пятна. В дополнение отмечается, что если ширина щели равна 0,5 мм, а не 0,3 мм, колебания результатов меньше. Положение этой щели по отношению к пятну также имеет значение. Патаки [9] показал возможность возникновения ошибки, вызванной смещением щели на миллиметр в каждую сторону от оптимального положения. Автор рекомендует слегка смещать щель в каждую сторону относительно ее положения при первоначальном сканировании, чтобы убедиться в том, что первоначальное сканирование происходило в истинном максимуме пика.

На результаты может также влиять количество влаги в слое. Путем промера одних и тех же пластинок до и после хранения в различных условиях Даллас [226] обнаружил изменение в площади пика порядка 1 % при изменении относительной влажности на 3 %.

При измерении серии пластинок положение сканирующего устройства следует отладить для каждого пятна, поскольку

даже небольшие колебания R_f могут оказать влияние на результаты.

Пластинку можно сделать более прозрачной, если опрыскать ее смесью парафина с эфиром (1:1) [228]; однако, как было обнаружено [2] при работе с чувствительными приборами, такая методика приводит к большим ошибкам. Томас и др. [229] нашли, что опрыскивание раствором минерального масла в эфире уменьшает рассеивание света, а это приводит к существенному снижению чувствительности. Поэтому авторы [229] предпочитают снижать влияние рефракции методом Бланка и др. [230], помещая узкую щель под и над хроматографической пластинкой.

Сканирование пятна проводят либо параллельно направлению разделения, либо перпендикулярно ему. При параллельном направлении основная линия может не возвращаться на прежний уровень по следующим причинам: а) растворитель оставляет узкий «хвост» в центре; б) пятна разделены не полностью; в) между разделенными пятнами находятся адсорбированные загрязнения. Поэтому направление сканирования следует выбирать в соответствии с конкретными условиями. Турано и Тернер [231] нашли, что выгодно усреднить результаты при сканировании в обоих направлениях. Установлено [219], что подобная методика полезна и при сканировании зон неправильной формы. Усреднение повторных промеров также позволяет уменьшить ошибку анализа.

При сканировании пятен пользуются самописцем с интегратором, получая число, пропорциональное площади кривой. Если, однако, самописец не возвращается к исходному положению основной линии по причинам, указанным выше, полученное численное значение, а следовательно, и площадь ошибочны. Поэтому лучше всего измерять площадь планиметром, даже если это занимает больше времени. При измерениях планиметром скорость ленты должна быть велика [226]. Ошибки при использовании планиметра можно уменьшить, усредняя результаты повторных измерений. Другие методы измерения площади, например с помощью миллиметровой бумаги, менее точны. Ваксмундский и Розуло [232] обнаружили, что площади пятен и пиков денситометрических кривых зависят от удельной поверхности адсорбента, природы подвижной фазы, коэффициента вязкости растворителя, а также от скорости разделения.

Бетке и Фрай [233] измерили отражение [220] по методу парных данных. Они наносили пятна растворов сравнения и стандартных растворов, благодаря чему для каждой концентрации раствора образовывалась пара пятен, каждое из которых размещалось друг от друга на расстоянии, равном половине ширины пластины. Каждое пятно измеряли дважды в прямом

и дважды в обратном направлении параллельно направлению разделения. Полученные для данного раствора четыре результата отсчета усредняли. Относительное стандартное отклонение в этих условиях $+1,4\%$.

Трайбер и др. [234—236] вывели уравнение, основанное на теории Ламберта—Бера и Кубелки—Муна. Используя это уравнение и применяя для сканирования пятна параллельными линиями на расстоянии 2 мм круглое отверстие диаметром 1 мм и интегрирование результатов, Трайбер [236] достиг стандартного отклонения $\pm 0,46\%$, в то время как уравнение Ламберта—Бера дает стандартное отклонение $\pm 3,2\%$, а уравнение Кубелки—Муна $\pm 2,4\%$.

В денситометрии желательно использовать спектрометр с двумя длинами волн. В нем два луча света с различными длинами волн, одна из которых соответствует пику поглощения, а другая слегка смещена относительно этого пика, попеременно освещают пятно. При соответствующей электронной схеме фоновая оптическая плотность при этом уменьшается без снижения чувствительности прибора. Салгаников и др. [237], основываясь на работе Чанса [238, 239], описали предназначенный для хроматографии на бумаге спектрофотометр с двумя длинами волн. Этот прибор назван так, чтобы его можно было отличить от обычных двухлучевых приборов, в которых луч расщепляется так, что одна часть проходит через пятно, а другая — через холостой участок пластинки, адсорбционные характеристики и характеристики рассеивания которого могут быть иными.

В количественной ТСХ с успехом используют небольшие ЭВМ. Поллак [240] обсудил различные аспекты применения ЭВМ, сравнил аналоговые машины с цифровыми при определении площади под кривой путем подгонки истинного распределения концентрации к идеальному распределению. Эта последняя методика позволяет рассчитать малые концентрации с повышенной точностью и провести расчеты при перекрывании пиков. Опубликован ряд работ [241—251], показывающих полезность этой методики в денситометрии. Эбел и Хокке [252] описали систему автоматического сканирования пластинок в ТСХ, согласно которой численные значения площадей пиков, измеренные электронным интегратором, подавали на включенный последовательно настольный калькулятор, который сразу же выдавал данные.

Разработан денситометр на легком лазере [253], который, как утверждают, дает значительно большее разрешение по сравнению с денситометрами с обычными источниками света. Повышенная степень разрешения получена в результате сужения светового пучка до 3—10 мкм без применения щели.

Разработаны и другие методы денситометрии пятна. Например, пятно можно фотографировать или фотостатировать и затем обработать полученный рисунок денситометром [254—261]. Бланк и др. [257] получали автордиограммы хроматографической пластинки, содержащей радиоактивные липиды, и затем промеряли денситометрически рентгеновские пленки. Хейфендель [254] и Вюке [258] перед фотографированием обрабатывали пластинки так, чтобы те стали прозрачными, и промеряли негативы денситометром. Авторы работ [259—260] пользовались пленками Polaroid, а Джекобсон [261] описал одностадийный фотографический метод.

Гудал [262] рассмотрел наиболее существенные факторы, на которые необходимо обращать внимание при приготовлении и сканировании тонкослойных пластинок, особенно если работа ведется в УФ-области.

Поллак [262a] и Трайбер [263] усовершенствовали спектроденситометры, предназначенные для работы в ТСХ.

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛОЩАДИ ПЯТНА

Полуколичественное определение при визуальном сравнении пятен

Для быстрого полуколичественного определения содержания компонентов в тонкослойных пятнах пользуются визуальным сравнением размеров пятна и интенсивности его окраски (или и того, и другого) с соответствующими характеристиками известных стандартных пятен. С этой целью на холостую часть пластинки наносят ряд стандартных пятен с тем, чтобы охватить всю область предполагаемой концентрации неизвестного соединения. Ошибка в подобных анализах в зависимости от тщательности проведения отдельного опыта составляет от ± 5 до 30%. Таким способом проведены анализы углеводов [264], спиртов [265], кислот [59], алкалоидов [266—268], взрывчатых веществ [269], терпенов [270—271], лекарственных препаратов [272, 273], пигментов [274], витаминов [275], антибиотиков [276], стероидов [277—279], липидов [280—282], пестицидов [283], минеральных масел [284] и неорганических ионов [285—287].

Зависимость между площадью пятна и его массой

Количественные методы, используемые в хроматографии на бумаге, связывают размеры пятна с количеством содержащегося в нем соединения, и, естественно, эти методы были распро-

странены и на ТСХ. В различное время было предложено несколько вариантов основного метода, однако ни одну из этих модификаций нельзя рассматривать как универсальный метод.

На размер пятна и, следовательно, на точность проведенного анализа влияет ряд факторов [287, 288]. В частности, необходимо, чтобы:

- 1) адсорбент был однородным, т. е. размеры частиц и активность его отвечали требованиям;
- 2) толщина слоя была равномерной, т. е. чтобы пластинки готовились по единой методике;
- 3) размеры стартовых пятен были одинаковыми; по этой причине концентрации растворов не должны заметно различаться;
- 4) микробюретки или капиллярные пипетки были точно откалиброваны;
- 5) давление паров в камере для разделения было постоянным;
- 6) применяемые растворители обеспечивали четкое разделение соединений;
- 7) реактивы были подобраны так, чтобы обеспечить четкое контрастирование пятен;
- 8) опрыскивание реактивами было равномерным;
- 9) разделение стандартных растворов и растворов проб проводилось одновременно.

Петрович [289] установил линейную зависимость между площадью пятна и количеством двух инсектицидов гаммексана и ДДТ. Эта же зависимость оказалась справедливой для шести компонентов дегтя. Зайлер [287] использовал линейную зависимость для определения неорганических ионов, а Зеер [290, 291] — зависимость площади от массы для анализа антиоксидантов, хотя в этом последнем случае зависимость фактически не была линейной. Бреннер и Нидервизер [292] анализировали аминокислоты и построили кривую зависимости площади пятна от логарифма массы пробы и использовали для определения тот отрезок кривой, который в области определения был линейным. Оранже и др. [293] разделяли различные фенолы и получили линейную зависимость квадрата площади пятна от массы материала.

Пурди и Трутер [294, 295] исследовали 16 различных соединений и установили линейную зависимость между квадратным корнем из площади пятна и логарифмом массы соединения. Площади пятен измеряли, накладывая лист кальки на хроматограмму и срисовывая контур пятен. Это скалькированное изображение хроматограммы помещали затем на диаграммную миллиметровую бумагу, чтобы можно было определить площадь пятен. Для повышения точности метода одновременно с неиз-

вестными пробами следует этим же методом промерить стандартные пробы.

Чтобы избежать построения калибровочных кривых для каждого опыта, Пурди и Трутер применили алгебраический метод, требующий анализа только трех проб: раствора смеси, подлежащей анализу, разбавленного раствора этой же смеси и стандартного раствора. В случае необходимости можно еще проанализировать разбавленный раствор стандарта. Все пробы наносят на одну и ту же пластинку и после разделения описанным выше методом определяют площади различных пятен. В уравнение подставляют следующие величины: W и A — масса и площадь пятна раствора пробы; W_s и A_s — масса и площадь пятна стандартного раствора; A_d и d — площадь пятна разбавленного раствора пробы и коэффициент разбавления соответственно. Авторы назвали этот анализ W_s -методом.

$$\lg W = \lg W_s + \frac{\sqrt{A} - \sqrt{A_s}}{\sqrt{A_d} - \sqrt{A}} \lg d.$$

Из двух методов, предложенных Пурди и Трутером, первый, так называемый графический метод, менее точен: ошибка определения составляет $\pm 4,3\%$. Точность W_s -метода выше: ошибка определения составляет $\pm 2,7\%$ для хроматографических опытов и $3,6\%$ для распределительного разделения.

Освальд и Флук [288] исследовали различные методы установления связи между площадью пятна и количеством вещества на тонкослойных хроматограммах. Эти авторы на примере многих хроматограмм подтвердили данные Пурди и Трутера. Однако во многих случаях зависимость площади пика пятна от массы вещества не была линейной. Поэтому они разработали методику, основанную на том, что на любой кривой можно найти короткие участки с линейной зависимостью. Освальд и Флук исследовали зависимость размеров пятна от массы на примере различных веществ и обнаружили, что в пределах $\pm 20\%$ измеряемой величины можно найти достаточно хорошо выраженную линейную область, выше которой размер пятна сильно уменьшается с ростом количества вещества. В то же время ниже этой точки небольшие размеры пятна сильно увеличивают ошибку. Для изученных алкалоидов была эмпирически выделена оптимальная область размера пробы. Площадь пятен авторы измеряли планиметром. Результаты проведенных измерений показали, что площадь пятна должна быть не менее 100 мм, чтобы ошибка измерения была минимальной.

Найбом [296] исследовал зависимость площадь — масса и нашел, что на характер этой зависимости влияет толщина слоя. Для тонкого слоя обнаружена линейная зависимость между

логарифмом массы и площадью, а для толстого слоя — линейная зависимость между массой и корнем квадратным из площади пятна. Найбом нашел также, что на вид зависимости масса — площадь влияет также природа соединений, используемых для обнаружения. Так, если пятна β-аланина обрабатываются изатином, зависимость $I_g(\text{площади}) - I_g(\text{количества вещества})$ линейная, если такие же пятна обрабатываются нингидрином, наблюдается линейная зависимость площадь пятна — $I_g(\text{количества вещества})$.

4. ПРЕДЕЛЬНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Этот метод количественного анализа был одним из первых, использованных в ТСХ в 1954 г. Кирхнером и др. [35]. Как и спектрофотометрический метод, он разработан для определения дифенила в плодах цитрусовых и в продуктах их переработки. Предварительное приготовление пробы проводится так же, как и при проведении спектрофотометрического определения. Приготовленный раствор гептан—масло—дифенил разбавляют н-гептаном в соотношении 1:10 и 1:100. Тонкие слои готовят из кремневой кислоты с добавлением 2,5 % крахмала в качестве связующего и сульфида цинка-кадмия и силиката цинка в качестве флуоресцентной добавки. Водной суспензией этой смеси покрывают стеклянные пластинки размером 13×136 мм, на которые наносят только одно пятно. Если желательно нанести на одну пластинку несколько пятен, то пользуются пластинками большего размера. Пятно пробы наносят пипеткой емкостью 0,01 мл; удобнее, однако, дозировочный микрошприц, поскольку в этом случае уменьшается число необходимых разбавлений. Наносят ряд пятен по 0,01 мл растворов различного разбавления. Разделение ведут перегнанным петролейным эфиром (т. кип. 30—60°C), пока растворитель не достигнет линии, удаленной на 5 см от исходной (~7 мин); после этого полоски удаляют и избыток растворителя испаряют на воздухе. Рассматривая хроматограмму в УФ-свете, можно обнаружить на ней темные пятна дифенила на флуоресцирующем фоне. Затем разбавление раствора увеличивают, пока не получат хроматограмму, на которой обнаруживается слабое, но отчетливое темное пятно дифенила. Это количество дифенила и принимают за минимально определяемое. Поскольку для разных хроматографистов оно может быть различным, каждый из них должен определять эту величину лично для себя; приближенно она составляет 0,55 мкг дифенила. Зная коэффициент разбавления и количество раствора, нанесенное в виде пятна на хроматограмму, можно легко рассчитать содержание дифенила в пробе. Из-за концентрационных эффектов, связанных с упав-

риванием при приготовлении пробы, этот метод позволяет определить 0,05 мг/л дифенила в 1500 мл сока или 1,5 мг/л дифенила в 50 мл сока отдельного плода. Средняя ошибка, полученная в результате анализа 19 проб с содержанием дифенила от 0,5 до 575 мг/л, составляла 11,3 %. Этот метод был распространен и на другие тонкослойные определения.

Бродбент и др. [297] определяли таким способом количества афлатоксина В в земляных орехах и продуктах их переработки. Пробу в этом случае готовят, экстрагируя измельченные земляные орехи метанолом; полученный экстракт переводят затем в раствор хлороформа для сушки и концентрирования. Экстракт наносят на слои оксида алюминия с алебастром в качестве связующего. После разделения 1,5 %-ным раствором метанола в хлороформе пластинки рассматривают в УФ-свете. Афлатоксин В дает сине-пурпурные флуоресцирующие пятна. Последовательным разбавлением раствора пробы находят минимальное определяемое пятно.

Хассельквист и Яарма [298] использовали этот метод для определения аскорбиновой кислоты в клубнях картофеля. Для обнаружения пятен аскорбиновой кислоты они опрыскивали пластинки раствором фосфомолибденовой кислоты. В этом случае минимально определяемое количество составило 0,2 мкг аскорбиновой кислоты. Лагони и Вортмен [299] определяли таким методом β-каротин и витамин А в жирах и маслах.

Пилли и др. [299a] разработали фотографический метод определения минимальной экспозиции, при которой данное пятно уже не появляется на фотографии.

5. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБА

Хотя биологическая проба в принципе не позволяет добиться такой правильности и воспроизводимости, какая возможна в химическом анализе, в некоторых случаях она дает важные результаты. Этим методом, в частности, были определены различные соединения, содержащиеся в тонкослойных пятнах. Используя *Bacillus pumilus*, посеянную на пластинках агара, Бродаски [300] определял сульфаты неомицина. Разделение неомицинов он проводил на тонкослойных угольных пластинках, изготовленных из суспензии 30 г растительной сажки нухар (С-190-N) и 1,5 г алебаstra в 220 мл дистиллированной воды, которую целесообразно подкислить серной кислотой до pH 2. Приготовленную таким образом суспензию выдерживают 16 ч. После нанесения пробы и разделения пластинки помещают не менее чем на 5 мин в атмосферу аммиака, чтобы нейтрализовать избыточную кислотность, которая может подавлять рост микроорганизмов. Антибиотики детектируют и анализируют,

поместив лицевую часть хроматограммы в противень с агаром стрептомицина, засеянного $2 \cdot 10^5$ клеток *B. pumilus* на миллилитр. Пластинку выдерживают на агаре 5—10 мин, после этого агар выдерживают в термостате 16 ч при 28°C. В это время не нужно пытаться удалить частички углерода, прилипшие к агару; после завершения инкубационного периода поверхность агара можно увлажнить и очистить покровным стеклом микроскопа, осторожно проводя им по поверхности. Количество вещества определяют по диаметру зоны с помощью стандартной кривой зависимости I_g (количества) — диаметр зоны. Если пятна не круглые, бóльшей точности, по-видимому, можно достичь, используя вместо диаметра зоны ее площадь. Петерсон и Эдингтон [301] определяли количество фунгицида бенонила по зависимости диаметра зоны ингибирования от логарифма количества этого фунгицида.

Хортон и Томсон [302] определяли методом биологической пробы простагландины, элюируя пятна с тонкослойной пластинки и нанося растворы на атропинизированную двенадцатиперстную кишку кролика и толстую кишку хомяка. Одновременно для сравнения проводили опыты с чистым простагландином E_1 .

Калдвей и Шталь [303] пользовались хорошо известной пробой Авены для анализа ауксинов, разделенных методом ТСХ. Пятна вместе с адсорбентом диоксидом кремния соскребали с пластинки и равномерно размазывали по блокам агара. Эти блоки выдерживали в темноте по крайней мере 30 мин, чтобы ауксины успели прорифундировать в агар до начала опыта. Степень извлечения введенной индолуксусной кислоты составляла примерно 85%. При этом наблюдался синергетический эффект влияния силикагеля и кальция на рост жесткокрылых *Tribicum* [304, 305], поэтому в анализах подобного рода эту активность следует учитывать.

Сима и Мантован [306] сравнивали результаты микробиологического анализа витамина B_{12} с использованием *Lactobacillus leichmanii* ATCC 7830 с результатами спектрофотометрического анализа, проведенного после выделения витамина на тонких слоях силикагеля.

Сало и др. [307] оценивали токсичность остатков инсектицида методом биологической пробы с *Drosophila melanogaster*.

Билоу и Спикер [308] описали метод, при котором засеянный агар наливали поверх хроматографических полос; после инкубации слои агара снимали с хроматограммы тупыми хирургическими щипцами и помещали на стеклянные пластинки для денситометрии.

Данные, подтверждающие полученные этими авторами результаты, отсутствуют.

6. РАДИОАКТИВНЫЕ МЕТОДЫ

Разработан ряд радиоактивных методов количественного определения соединений, разделенных ТСХ. Пробы можно пометить прямой реакцией с компонентами, например путем этерификации кислот радиоактивным диазометаном [309], или методом изотопного разбавления, добавляя известное количество радиоактивного компонента к разделяемой смеси [186, 310]. Шульце и Венцель [311] пользовались методикой Вильцбаха [311, 312] и метили соединения тритием. Эти соединения, разделенные на слоях, можно определить методами: 1) автордиографии; 2) автосцинтиллографии; 3) элюированием с последующим анализом радиоактивности; 4) сканированием полос детекторами Гейгера — Мюллера; 5) сканированием полос детекторами на фотоэлементах; 6) двумерного сканирования с использованием детектора нового типа на электронных умножителях; 7) двумерного сканирования с β -камерой; 8) сжигания; 9) зонального профильного сканирования с использованием жидкостного сцинтилляционного детектирования и 10) сублимационной автографии. Радиоактивным методам и применению их в ТСХ посвящен ряд обзоров и статей [313—316].

Автордиография

Достоверность количественного определения радиоактивности зависит от того, каким оборудованием располагает экспериментатор. Можно приготовить радиоавтограф и определить плотность радиogramмы, как описано в разделе о денситометрии пятна. При получении радиоавтограммы рентгеновскую пленку помещают непосредственно на слой адсорбента или на тонкую полимерную пленку, которой закрывают хроматограмму. В последнем случае длительность экспозиции следует увеличить, так как эта пленка поглощает излучение. Швейн и Након [317] приводят данные о поглощении β -излучения различными полимерными пленками: 0,00025 Myler (22%); 0,0005 Myler (39%), Saran Wrap (45%) и Handiwrap (24%). Если рентгеновскую пленку помещают непосредственно на тонкий слой, необходимо убедиться, что фотографическая активность не увеличивается в результате сублимации соединения в фотопленку [318] (последний эффект положен в основу метода, названного сублимационная автография). В последнем случае почернение фотопластинки может быть вызвано как химической реакцией, так и действием излучения.

Слой можно непосредственно пропитать фотографической эмульсией сразу после хроматографического разделения компонентов пробы [319]. Однако фотоэмульсия загрязняет пятно, что, естественно, нежелательно, если соединения необходимо извлечь; кроме того, непосредственный контакт эмульсии с соединением может привести к химической реакции.

Для автордиографии можно пользоваться вместо рентгеновской пленки пленкой Polaroid 57 [320, 321], которая по времени экспозиции сравнима с рентгеновской пленкой, а иногда, например при определении радиоактивного изотопа иода [321], более чувствительна. В работе [320] дано описание кассеты, предназначенной для пленки Polaroid.

Автосцинтиллография

Одна из проблем, возникающая при использовании автордиографии, заключается в том, что из-за низких энергий β -частиц, в особенности в случае трития, большая часть энергии поглощается хроматографическим слоем так, что пленкой регистрируется лишь небольшое число электронов. Один из методов преодоления этого затруднения сводится к включению в слой сцинтиллятора, который излучает свет при поглощении β -частиц. Свет, поглощаемый в гораздо меньшей степени, чем β -частицы, можно зарегистрировать пленкой. Этот метод получил название автосцинтиллография, сцинтография, или сцинтилляционная флуорография. Сцинтиллятор можно наносить на адсорбент разными способами: погружением пластинки, опрыскиванием ее, можно также добавлять сцинтиллятор к суспензии при приготовлении слоя.

Рандерат [322] установил, что чувствительность этого метода в основном зависит от пяти факторов: 1) концентрации сцинтиллятора; 2) природы растворителя, используемого при нанесении сцинтиллятора на хроматограмму; 3) метода нанесения сцинтиллятора; 4) температуры, при которой экспонировали пленку; 5) сорта используемой пленки. Кроме того, на чувствительность оказывает влияние ряд дополнительных факторов [322, 323]. Оптимальная концентрация сцинтиллятора меняется для различных сцинтилляторов; так, для радиоуглерода она больше, чем для трития [324]. Низкая температура во время экспозиции увеличивает чувствительность к радиоуглероду примерно вдвое, а при -78°C чувствительность к тритию возрастает примерно в 50—100 раз [325]. В последней работе обсуждаются причины такого усиления чувствительности. Оказалось, что при низких температурах бензол ведет себя как эффективный твердый сцинтиллятор. Более того, бензол очень удобно использовать в этой роли, так как его можно испарить

со слоя и тем самым освободить хроматограмму от загрязнений сцинтиллятором [326]. Чувствительность, конечно, можно увеличить, получая по возможности более компактные пятна. Поскольку почти на всех имеющихся в продаже пленках эмульсия нанесена с обеих сторон опорного слоя, из которых лишь одну используют для сцинтиллографии, фоновую плотность можно в известной мере снизить, предотвращая контакт эмульсии на задней стороне пленки с проявляющим раствором. Этого достигают, прикрепляя во время процесса проявления к обратной стороне фотографической пленки дополнительную опорную пленку с водонепроницаемой тесьмой [327].

Сканирование полосы

Радиоактивность измеряют непосредственно на тонкослойной пластинке счетчиком Гейгера с тонкостенным торцевым окошком [328, 329] или проточным газовым счетчиком [309, 311, 330, 336]. Последний, конечно, более чувствителен и более пригоден для измерения β -излучающих радиоизотопов с низкой энергией. Приборы для сканирования полос выпускает ряд фирм; Снайдер [332, 333] в двух обзорах описывает некоторые такие приборы. Прайдз [334] рассматривает современное состояние дел в области радиохроматографии; он составил таблицы, которыми могут руководствоваться все занимающиеся сканированием тонкослойных хроматограмм. Ревенхил и Джеймс [331] описали простое чувствительное сканирующее устройство, в котором используется счетчик с открытым окошком и автоматическим счетным интегрирующим устройством.

Один из вариантов метода прямого измерения радиоактивности на хроматографической пластинке предусматривает обработку слоя полимерным связующим [317, 335, 337]. После такой обработки хроматограмму удаляют с опорной пластинки, разрезают на полоски и промеряют в приборе, предназначенном для сканирования хроматограмм на бумаге. При опрыскивании пластинки суспензией полимера на поверхность пластинки помещают кусок прозрачной ленты, чтобы легче было снять адсорбент. Слой следует затем повернуть и слегка опрыскать этой же суспензией с обратной стороны, чтобы предотвратить возможность потери частиц адсорбента [335]. Скиб [338] использовал опорный слой из пластмассы. После нанесения пробы, разделения и сушки хроматограмму опрыскивают суспензией полимера, чтобы закрепить хроматограмму на опорной полосе из пластмассы. Всю пластинку разрезают затем на полоски для сканирования в стандартном устройстве. Для покрытия хроматограмм радиоактивными водорастворимыми

веществами Шван и Након [317] пользовались раствором 11,2 г полистирола в 100 мл бензола и добавляли в него пластификатор. Количество пластификатора зависит от типа адсорбента; для силикагеля G и кизельгура G — это 0,023 и 0,014 мл соответственно в расчете на каждый миллилитр раствора полистирола. Радиоактивность измеряют с гладкой стороны пленки, соприкасающейся со стеклянной поверхностью, что предотвращает поглощение пленкой клея энергии слабых излучателей [335]. Имеющиеся в продаже хроматографические полоски также удобно использовать в приборах для сканирования.

Двумерное сканирование

Для двумерного сканирования разработано большое число приборов. В β -камере фирмы Baird Atomic используется 1622 счетчика Гейгера—Мюллера, что позволяет снять на осциллограф мгновенную диаграмму распределения радиоактивности по всей тонкослойной пластинке размером 20×20 см. Постоянную запись осуществляют с помощью камеры Polaroid. Хотя прибор и дорог, он весьма удобен при применении короткоживущих изотопов, требующих быстрой работы, и для извлечения соединений без загрязнения сканителем.

Арноф [339] разработал двумерное сканирующее устройство с одной трубкой Гейгера—Мюллера в соединении с самописцем с электрочувствительной бумагой; Джильтберт и Кин [340] проводили обнаружение радиоактивности хроматографических полос с помощью ряда счетчиков. Венцель и Хофман [341] применили обычное устройство для сканирования двумя методами двумерных хроматограмм. Гарихаран и др. [342] создали сканирующее устройство из 12 торцевых галогенных счетчиков Гейгера—Мюллера для быстрого определения радиоактивности влажной электрофореграммы при 0°C . Возможность проведения двумерных измерений достигают поддерживающими салазками, перемещающимися механически; запись осуществляют, применяя электрочувствительную бумагу. Хотя это устройство предназначено для хроматографии на бумаге, оно вполне пригодно и для тонких слоев. Для измерения трития следует пользоваться счетчиком без окна.

Придц и др. [343] использовали новый тип детектора на электронном умножителе и разработали прибор для одно- и двумерного сканирования и добавили устройство для компьютерного контурного изображения результатов [344]. Лове [345] описал устройство, передающее данные на перфоленду, которую после этого можно передать на компьютер для обработки результатов.

В работе [346] рассматривается метод повышения информативности данных измерения радиоактивности методом накопления и преобразования Фурье.

Тиква [347] разработал полукондуктографический метод измерения без разрушения образца с применением кремниевого барьерного детектора [348]. Благодаря низкому фону ($0,02 \pm \pm 0,01$ отсч./мин) таким способом удается добиться высокой чувствительности. Этот прибор позволяет проводить одновременное определение β -частиц в соединениях, меченных изотопами в разных положениях [349].

Авторы некоторых работ предлагают в качестве количественного метода двумерное детектирование с искровой камерой [350], однако эта камера в принципе предназначена только для качественного определения*.

Методы жидкостной сцинтилляции

К числу приборов, применяемых в ТСХ, относится также сцинтилляционный счетчик [116, 186, 351—358]. Разработаны два основных метода его использования. В одном из них анализируемые вещества элюируют с адсорбента и удаляют растворитель (если растворитель окисляется кислородом воздуха, его рекомендуется удалять в атмосфере азота). Остаток смешивают с жидким сцинтиллятором и измеряют радиоактивность с помощью соответствующей аппаратуры. Сцинтилляционные счетчики пригодны также для измерения количества адсорбированного силикагелем вещества без предварительного элюирования последнего при соблюдении соответствующих мер предосторожности. Чтобы предотвратить самогашение, силикагелю не дают осесть, добавляя к жидкому сцинтиллятору желатинирующий реактив. Снайдер и Стефенс [356] суспендировали адсорбент в 15 мл 4 %-ного (масса/объем) раствора кабсила (порошок тиксотропного геля, фирма Packard) в толуольном сцинтилляторе, содержащем 5 г 2,5-дифенилоксазола (РРО) и 0,3 г *n*-бис-[2-(4-метил-5-фенилоксазолил)]бензола (РОРОР) в литре тоуола. Чтобы избежать потери некоторой

* Французская фирма Numelec разработала прибор Chromelec для измерения распределения радиоактивности на пластинках для ТСХ и электрофореза. Этот прибор «видит» измеряемую часть пластинки по всей длине одновременно, что позволяет существенно, в 10—100 раз, ускорить проведение измерений. Прибор допускает одновременное измерение радиоактивности по двум изотопам, например ^3H и ^{14}C , с высокой чувствительностью: $5 \cdot 10^{-7}$ мкКи/мм² для ^{14}C и $1,2 \cdot 10^{-6}$ мкКи/мм² для ^3H .

Оригинальный прибор с пропорциональной камерой разработан для радиохроматического анализа в ТСХ Ю. С. Анисимовым и сотрудниками [см. J. Chromatogr., 178, 117 (1979)].—Прим. ред.

доли радиоактивности, поглощаемой нижней частью колпачка счетной пробирки, они закрывали пробирку липкой лентой (Scotch), тщательно подрезав по окружности отверстие перед встряхиванием всего устройства. Чтобы предотвратить адсорбцию некоторых полярных липидов поверхностью стеклянных счетных пробирок, следует применять полиэтиленовые пробирки. Этим методом удалось достичь степени извлечения радиоактивности $99 \pm 2,2\%$. При разделении рассматриваемым способом жирных кислот на силикагеле с использованием неокислотного растворителя непосредственно в счетную пробирку следует ввести 50 мкл уксусной кислоты, чтобы предотвратить уменьшение эффективности счета. Риондель и др. [352] в своих сцинтилляционных измерениях использовали в ряде случаев тот же тип порошка тиксотропного геля. Это, в частности, необходимо при измерениях неацелированных тиосемикарбазонов стероидов, которые обычно адсорбируются на стенках стеклянных или пластмассовых счетных пробирок. Адсорбцию удалось предотвратить, добавляя в жидкий сцинтиллятор этанол и тиксотропный гель.

Рукейрол и Тайландье [354] измеряли сцинтилляцию непосредственно на пластинке геля после соответствующей обработки. Стеклоплатинку хроматограммы прикрепляли к алюминиевой полосе с загнутыми вверх краями, которая выполняла роль сосуда для хранения сцинтиллятора; раствор по каплям подавали на тонкий слой, пока он не становился полупрозрачным. После этого добавляли 10 мл желатинизированного сцинтиллятора, приготовленного добавлением нескольких граммов 2-этилгексаноата алюминия к 200 г толуольного основного сцинтиллятора.

Ривлин и Вилсон [353] описали простой метод отделения стероидов от жидкого сцинтилляционного фосфора хроматографическим разделением на тонких слоях силикагеля с этилацетатом. Метод этот можно, по-видимому, применить и к нестероидным соединениям, например с тем, чтобы утилизировать isotopные материалы.

Шнайдер [359] сравнил сканирование полос, при котором радиоактивный материал применяют непосредственно на тонком слое, с зональным сканированием, при котором адсорбционный материал соскребают последовательно слой за слоем и анализируют методом жидкостной сцинтилляции. Чувствительность и степень разделения были больше при зональном сканировании. Разработаны ручные [360] и автоматические [361] (Analabs) устройства для соскребания; вся система автоматизирована, в том числе и последовательное подключение компьютеров [362]. Фослиен и др. [363] разработали регулируемый компьютером скребок для удаления отдельных пятен в опреде-

ленной последовательности с тонкослойной пластинки с автоматической подачей на сцинтилляционные приборы либо в контейнеры.

Следует внести поправку на тушение, связанное с адсорбцией β -излучения полярными соединениями, остающимися на адсорбенте. Кричевский и др. [364] рассмотрели прямые и косвенные методы внесения таких поправок и разработали систему, основанную на использовании компьютера, для внесения поправок при измерении интенсивности счета жидкими сцинтилляторами. Боск и др. [365] опубликовали программу на языке Фортран IV для анализа дважды меченных проб жидких сцинтилляторов с неравномерным тушением. Груенштейн и Смит [366] описали метод радиографии, позволяющий идентифицировать на хроматограмме два соединения, меченные ^3H и ^{14}C . На автордиографической пленке, экспонированной 24 ч, обнаруживается ^{14}C ; последующее наложение на хроматограмму сцинтиллирующего фтора позволяет через 4 ч увидеть на хроматограмме ^3H , в то время как для обнаружения ^{14}C по-прежнему требуется 24 ч. Чтобы устранить тушение, вызываемое адсорбентом, Шоу и др. [367] растворяли в сцинтилляционной пробирке силикагель в плавиковой кислоте. Боллингер и др. [368] использовали для гель-сцинтилляционного счета при суспендировании нерастворимых соединений комплекс толуольной смеси типа комплекса внедрения мочевины. Метод прост и не требует много времени.

Фирма J. T. Baker Chemical Co. опубликовала руководство для измерения счета жидкими сцинтилляторами, содержащее ряд полезных таблиц, включая таблицу для решения задач, возникающих при использовании этого метода.

Метод сжигания

Радиоактивные пробы сжигают в атмосфере кислорода, продукты сжигания пропускают над оксидом меди, чтобы превратить углерод и водород в диоксид углерода и воду соответственно. Количество образующихся продуктов либо измеряют непрерывно, либо их собирают и измеряют методом жидкостной сцинтилляции. Печи сжигания и детекторы для непрерывного счета поставляют ряд фирм.

Гриффитс и Маллинсон [370] подробно описали конструкцию одной из таких печей. В этом случае воду конденсируют при низкой температуре, а углекислоту поглощают фенолэтиламином. Хаати и др. [371] проводили хроматографические анализы на слоях кремневой кислоты и оксида меди (2:3), покрывавших внутренние стенки стеклянных трубок. После разделения и полного удаления растворителя трубки помещают

в печь. Эта печь медленно перемещается вдоль трубки, через которую пропускают гелий. Образующуюся при сжигании воду поглощают хлоридом кальция или пентоксидом фосфора. Если проба мечена радиоактивным углеродом, его измеряют пропорциональным проточным детектором. Для нерадиоактивных веществ используют детектор по теплопроводности. Варианты этой методики (описанной в следующем разделе) разработаны и использованы для анализа нерадиоактивных соединений; при наличии соответствующих детекторов эти методы пригодны и для работ с радиоактивными веществами.

7. РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ

Для определения тонкослойных зон используется ферментативный анализ. Шайг и др. [372] анализировали этим методом окисленные и восстановленные нуклеотиды ди- и трифосфопиридинон.

Количественное определение галогенсодержащих соединений проводили методом сжигания в колбе [373]. Чтобы сгорание было полным, емкость колбы должна быть не менее 500 мл, а площадь пятна не более 2—3 см². Продукты сгорания определяли титриметрически. Аналогичным образом анализировали соединения, содержащие серу [374]; образовавшийся в этом случае сульфат обрабатывали раствором хромата бария и измеряли поглощение в области 370 нм.

В 1966 г. Конака и Терабе [375] разработали количественный метод, согласно которому пятна соскребали в платиновую лодочку и помещали в печь для сжигания. После вытеснения воздуха гелием, содержащим 2% кислорода, пробы сжигали; продукты сгорания пропускали через оксид меди, восстановленную медь, ангидрон, диоксид магния и, наконец, через колонку с углем, активированным при 100°C. При этом происходило газохроматографическое разделение азота и диоксида углерода; площадь пика азота определяли электронным интегратором. Несколько модифицировав печь для сжигания, можно применять эту методику и для определения углерода [376]. Чтобы поправка на холостой опыт была небольшой, пробу концентрировали по методу Де Дина и Веттера [30] на небольшой поверхности слоя.

Котгрейв и Лайнс [377] вводили хроматограмму, полученную на пластинке шириной 25 мм, непосредственно в трубку для сжигания, которую нагревали движущейся печью. Когда температура в печи достигала 700°C, летучие продукты током азота продували через пламенно-ионизационный детектор. Чтобы свести к минимуму фоновые загрязнения, тонкослойные пластинки перед нанесением на них пробы нагревали в печи

при 600°C. В качестве подложки для тонкого слоя Пэдлей [378, 379] использовал стеклянную палочку диаметром 0,5 мм. После разделения и сушки хроматограмму протягивали непосредственно через пламенно-ионизационный детектор. И в этом случае, чтобы фон был низким, слой перед нанесением пробы протягивали через пламенно-ионизационный детектор. В работе [380] описано устройство такого же типа, но авторы [380] предпочитают в качестве опоры для тонкого слоя проволоку.

Хаати и Яконмаки [381] предложили несколько другую методику сжигания. Разделение проводили на слоях, представлявших собой смесь кремневой кислоты и оксида меди (2:3), нанесенную на внутренние стенки 5-миллиметровой стеклянной трубки. После завершения разделения хроматограммы нагревали в движущейся печи, воду улавливали в ловушку, а углекислоту определяли катарометром. Применяя пропорциональный проточный детектор, можно определить радиоуглерод. Авторы работ [383—386] усовершенствовали методику с тем, чтобы можно было использовать слои, состоящие целиком из силикагеля, а также слои, представляющие собой смесь силикагеля и оксида меди. Продукты пиролиза можно непосредственно определять пламенно-ионизационным детектором. Их можно также направить в печь, а образовавшуюся углекислоту вместе с потоком газа-носителя водорода пропустить через никелевый катализатор, где углекислота образует метан, который можно определить пламенно-ионизационным детектором*.

* Применение для количественного анализа химических методов в сочетании с методами детектирования, используемыми в газовой хроматографии, представляется весьма перспективным.

Английская фирма Newman-Howells выпускает, на наш взгляд, удачный прибор Ятроскан TH-10 для количественного определения пламенно-ионизационным детектором продуктов, разделенных методом ТСХ.

Разделение образца (примерно 1 мкл) и последующее детектирование проводятся на специальных стержнях. Стержень из огнеупорного и химически стабильного материала, например кварца, размером 0,9×152 мм, на поверхность которого нанесен закрепленный слой адсорбента (силикагель со стеклом в качестве связующего агента) толщиной 100 мкм, переносится после разделения и высушивания в специальный магазин на 10 стержней, и по заданной программе последовательно каждый из стержней проходит через детектирующее пламя пламенно-ионизационного детектора. Когда через пламя проходит участок с хроматографической зоной разделенного вещества, детектор дает сигнал, пропорциональный количеству вещества, поступающего в пламя. Самописец регистрирует хроматограмму. Следует отметить, что когда стержень проходит через пламя, он регенерируется и, по утверждению фирмы, один стержень можно использовать для проведения 100 анализов.

В литературе описан ряд примеров применения приборов для анализа главным образом биологически активных веществ, лекарств и т. п. [см., например, Namba T., Yoshizaki M., et al., J. Pharmaceut. Soc. Japan, 94, 252 (1974); Okumura T., Kadono T., Japan Analyst, 22, 980 (1973)] — Прим. ред.

При пропускании через пиролизическую трубку в качестве газа-носителя смеси азот—кислород некоторые липиды, стероиды и терпеноиды не пиролизуются; в азоте же пиролиз их проходит полностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kirchner J. G., J. Chromatogr., **123**, 5 (1976).
2. Hara S., Tanaka H., Takeuchi M., Chem. Pharm. Bull., **12**, 626 (1964).
3. Fairbairn J. W., Relph S. J., J. Chromatogr., **33**, 494 (1968).
4. Fairbairn J. W., "Factors Involved in Producing Uniform Spots", in Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, E. J. Shellard, Ed., Academic Press, New York, 1968, p. 1.
5. Samuels S., J. Chromatogr., **32**, 751 (1968).
6. Brain K. R., "Operator Effect" in Quantitative Sample Application", in Quantitative Thin-Layer Chromatography, Fisons Scientific Apparatus, Loughborough, 1971, p. 39.
- 6a. Shellard E. J., Alam M. Z., J. Chromatogr., **33**, 347 (1968).
7. Truter E. V., Thin-Film Chromatography, Interscience, New York, 1963.
8. Klaus R., J. Chromatogr., **40**, 235 (1969).
9. Pataki G., Chromatographia, **1**, 492 (1968).
10. Touchstone J. C., Levine S. S., Murawec T., Anal. Chem., **43**, 858 (1971).
11. Graham R. J. T., Bark L. S., Tinsley D. A., J. Chromatogr., **39**, 211 (1969).
12. Grimm W., J. Chromatogr., **89**, 39 (1974).
13. Pollak V., J. Chromatogr., **105**, 279 (1975).
14. Boulton A. A., Pollak V., J. Chromatogr., **45**, 189 (1969).
15. Pollak V., Boulton A. A., J. Chromatogr., **45**, 200 (1969).
16. Boulton A. A., Pollak V., J. Chromatogr., **50**, 19 (1969).
17. Boulton A. A., Pollak V., J. Chromatogr., **50**, 39 (1969).
18. Klaus R., J. Chromatogr., **16**, 311 (1964).
19. Seiler N., Moeller H., Chromatographia, **2**, 470 (1969).
20. Seiler N., Moeller H., Chromatographia, **2**, p. 319 (1969).
21. Goldman J., Goodall R. R., J. Chromatogr., **32**, 24 (1968).
22. Goldman J., Goodall R. R., J. Chromatogr., **40**, 345 (1969).
23. Goldman J., J. Chromatogr., **78**, 7 (1973).
24. Kaiser R., Chromatographia, **4**, 123 (1971).
25. Kaiser R., Chromatographia, **4**, 215 (1971).
26. Kaiser R., Chromatographia, **4**, 361 (1971).
27. Kaiser R., Chromatographia, **4**, 479 (1971).
28. Pollak V., Boulton A. A., J. Chromatogr., **50**, 30 (1970).
- 28a. Touchstone J. C., Ed., Quantitative Thin-Layer Chromatography., Wiley, New York, 1973.
- 28b. Shellard E. J., Ed., Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, Academic Press, New York, 1968.
29. Mulder J. L., Veenstra G. J., J. Chromatogr., **24**, 250 (1966).
30. De Deyne V. J. R., Velters A. F., J. Chromatogr., **31**, 261 (1967).
31. Eberle D. O., Delley R. G., Székely G. G., Stambach K. H., J. Agric. Food Chem., **15**, 213 (1967).
32. Hastings P., Wong J. T., Anal. Biochem., **12**, 169 (1968).
33. Turchinsky M. F., Shershneva L. P., Anal. Biochem., **54**, 315 (1973).
- 33a. Falk H., Krummen K., J. Chromatogr., **103**, 279 (1975).
34. Court W. E., "Quantitative Thin-Layer Chromatography Using Elution Techniques", in Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, E. J. Shellard, Ed., Academic Press, New York, 1968, p. 29.
35. Kirchner J. G., Miller J. M., Rice R. G., J. Agric. Food Chem., **2**, 1031 (1954).
36. Clevenger J. F., J. Assoc. Off. Agric. Chem., **17**, 371 (1934).
37. Lazarow A., J. Lab. Clin. Med., **35**, 810 (1950).
38. Meloche C. C., Frederick W. G., J. Am. Chem. Soc., **54**, 3265 (1932).
39. Stanley W. L., Vannier S. H., Gentili B., J. Assoc. Off. Agric. Chem., **40**, 282 (1957).
40. Baxter R. A., J. Assoc. Off. Agric. Chem., **40**, 249 (1957).
41. Harris M. J., Stewart A. F., Court W. E., Planta Med., **16**, 217 (1968).
42. Boernig H., Reinicke C., Acta Biol. Med. Ger., **11**, 600 (1963).
43. Coffey R. G., Newburgh R. W., J. Chromatogr., **11**, 376 (1963).
44. Weiner L. M., Zak B., Clin. Chim. Acta, **9**, 407 (1964).
45. Ritter F. J., Canonne P., Geiss F., Z. Anal. Chem., **205**, 313 (1964).
46. Sawicki E., Stanley J. W., Elbert W. C., Pfaff J. D., Anal. Chem., **36**, 497 (1964).
47. Chatot G., Dangy-Caye R., Fontanges R., Chromatographia, **5**, 460 (1972).
48. Biernoth G., Fette, Seifen, Anstrichm., **70**, 217 (1968).
49. Davidek J., Pokorný J., Janiček G., Z. Lebensm. Unters. Forsch., **116**, 13 (1961).
50. Janicek G., Pokorný J., Davidek J., Sb. Vys. Sk. Chem.-Technol. Praze, Technol. Paliv, **6**, 75 (1962).
51. Lacharme J., Bull. Trav. Soc. Pharm. Lyon, **7**, 55 (1963).
52. Nano G. M., Sancin P., Ann. Chim. (Rome), **53**, 677 (1963); Chem. Abstr., **59**, 12189 (1963).
53. Pailer M., Kuhn H., Gruenberger I., Fachlich Mitt. Oesterr. Tabakregie, Pt. 3, **1962**, 33.
54. Pettersson G., J. Chromatogr., **12**, 352 (1963).
55. Abbott D. C., Thomson J., Chem. Ind. (London), **481**, (1964).
56. Abbott D. C., Thomson J., Analyst, **89**, 613 (1964).
57. Blinn R. C., J. Assoc. Off. Agric. Chem., **47**, 641 (1964).
58. Doi Y., Kagaku Keitsatsu Kenkyusho Hokoku, **16**, 51 (1963).
59. Bailey R. W., Anal. Chem., **36**, 2021 (1964).
60. Millett M. A., Moore W. E., Saeman J. F., Anal. Chem., **36**, 491 (1964).
61. Schantz M., Ivars L., Kukkonen I., Ruuskanen A., Planta Med., **10**, 98 (1962).
62. Sieper H., Longo R., Korte F., Arch. Pharm., **296**, 403 (1963).
63. Steidle W., Ann. Chem., **662**, 126 (1963).
64. Steidle W., Planta Med., **9**, 435 (1961).
65. Nussbaumer P. A., Pharm. Acta Helv., **38**, 245 (1963).
66. Nussbaumer P. A., Pharm. Acta Helv., **38**, 758 (1963).
67. Nekola M., Z. Anal. Chem., **268**, 272 (1974).
68. Baemler J., Rippstein S., Helv. Chim. Acta, **44**, 2208 (1961).
69. Gaenshirt H., Arch. Pharm., **296**, 129 (1963).
70. Gerritsma K. W., van Rheede M. C. B., Pharm. Weekblad, **97**, 765 (1962); Chem. Abstr., **58**, 6646 (1963).
71. Ragazzi E., Boll. Chim. Farm., **100**, 402 (1961), Chem. Abstr., **56**, 10283 (1962).
72. Schlemmer F., Link E., Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg., **104**, 1349 (1959).
73. Egger K., Planta, **58**, 664 (1962).
74. Grob E. C., Eichenberger W., Pflugshaupt R. P., Chimia (Aarau), **15**, 565 (1961).
75. Balek R. W., Szutka A., J. Chromatogr., **17**, 127 (1965).
76. Castren E., Farm. Aikak., **71**, 351 (1962).
77. Covello M., Schettino O., Farmaco Ed. Prat., **19**, 38 (1964).
78. Lambertsen G., Myklestad H., Braekkan O. R., J. Sci. Food Agric., **13**, 617 (1962).

79. Wagner H., Hoerhammer L., Dengler B., J. Chromatogr., 7, 211 (1962).
80. Zloch Z., Mikrochim. Acta, 1975, 213.
81. Korte F., Sieper H., J. Chromatogr., 14, 178 (1964).
82. Liukkonen A., Farm. Aikak., 71, 329 (1962); Chem. Abstr., 58, 8850 (1963).
83. Paquin R., Lepage M., J. Chromatogr., 12, 57 (1963).
84. Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Z. Anal. Chem., 181, 325 (1961).
85. Shellard E. J., Alam M. Z., J. Chromatogr., 32, 472 (1968).
86. Hansson J., Explosivstoffe, 10, 73 (1963).
87. Kuroiwa Y., Hashimoto H., Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd., 3, 5 (1960).
88. Kuroiwa Y., Hashimoto H., J. Inst. Brewing, 67, 347 (1961).
89. Stanley W. L., Vannier S. H., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 40, 582 (1957).
90. Gaenshirt H., Morianz K., Arch. Pharm., 293/65, 1065 (1960).
91. Covello M., Schettino O., "The Application of Thin-Layer Chromatography to Investigations of Antifermentatives in Foodstuffs", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 215.
92. Dancis J., Hutzler J., Levitz M., Biochim. Biophys. Acta, 78, 85 (1963).
93. Nano G. M., "Thin-Layer Chromatography of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Aliphatic Carbonyl Compounds and Their Quantitative Determination", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 138.
94. Roudier A., Assoc. Tech. Ind. Papet. Bull., 17, 314 (1963).
95. Bird H. L., Brickley H. F., Comer J. P., Hartsaw P. E., Johnson M. L., Anal. Chem., 35, 346 (1963).
96. 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.
97. Matthews J. S., Pereda-V. A. L., Aguilera-P. A., J. Chromatogr., 9, 331 (1962).
98. Harland W. A., Gilbert J. D., Brooks C. J. W., Biochim. Biophys. Acta, 316, 378 (1973).
99. Hunt R. C., Ellar D. J., Biochim. Biophys. Acta, 339, 173 (1974).
100. Bende E., Szabo A., Somogyi V., Sutoipar, 21, 226 (1971); through CAMAG Bibliogr. Serv., 36, 047 (1975).
101. Deters R., Chem.-Zig., 86, 388 (1962).
102. Esser K., J. Chromatogr., 18, 414 (1965).
103. Davis J. M., J. Chromatogr., 69, 333 (1972).
104. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuskiwicz H., Zagórski Z., J. Chromatogr., 17, 288 (1965).
105. Matsui F., Watson J. R., French W. N., J. Chromatogr., 44, 109 (1969).
106. Hurlbut J. A., J. Chem. Educ., 48, 411 (1971).
107. Eisenbrand G., Spaczynski K., Preussmann R., J. Chromatogr., 51, 503 (1970).
108. Buteau G. H., Jr., Simmons J. E., Anal. Biochem., 37, 461 (1970).
109. Sofrova D., Miksanova R., Leblova S., Vnitr. Lek., 15, 395 (1969); through Chem. Abstr., 71, 27810s (1969).
110. Gangloff J., Keith G., Dirheimer G., Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 125 (1970).
111. Gerstmeier A., Zentr. Pharm., Pharmakother. Laboratoriumsdiagn., 111, 821 (1972).
112. Frantau R., Mussche R., J. Inst. Brewing, 78, 450 (1972).
113. Bazzi B., Santi B., Canale G., Radice M., Montecatini, Ist. Ric. Agrar. Contrib., 1963, 12 pp.
114. Steller W. A., Curry A. N., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 645 (1964).
115. Heusser D., J. Chromatogr., 33, 400 (1968).
116. Myhill D., Jackson D. S., Anal. Biochem., 6, 193 (1963).
117. Rahandhra T., Chanez M., Boiteau P., Ann. Pharm. F., 21, 561 (1963).
118. Diley R. A., Anal. Biochem., 7, 240 (1964).
119. Katsui G., Ichimura Y., Nishimoto Y., Vitamin., 23, 35 (1961).
120. Кузнецова Л. М., Ковалова В. М., Украинский биохимический журнал, 36, 302 (1964).
121. Буленков Т. И., Медицинская промышленность СССР, 17, 26 (1963).
122. Fioro A., Marigo M., Nature, 182, 943 (1958).
123. Marigo M., Arch. Kriminol., 128, 99 (1961); through Chem. Abstr., 56, 5068 (1962).
124. Akazawa T., Wada K., Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 25, 30 (1961).
125. Липина Т. Г., Труды по химии и химической технологии, 1962, 424.
126. Seeboth H., Monatsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, 5, 693 (1963).
127. Seeboth H., Goersch H., Chem. Tech. (Berlin), 15, 294 (1963).
128. McLaughlin J. L., Goyan J. E., Paul A. G., J. Pharm. Sci., 53, 306 (1964).
129. Poethke W., Kinze W., Arch. Pharm., 297, 593 (1964).
130. Haefelfinger P., J. Chromatogr., 33, 370 (1968).
131. Липина Т. Г., Методы определения вредных веществ в воздухе, М., 1961, 41.
132. Липина Т. Г., Зав. лаб., 26, 55 (1960).
133. Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., J. Chromatogr., 11, 479 (1963).
134. Singh S., Stacey B. E., Analyst (London), 97, 977 (1972).
135. Raadsveld C. W., Klomp H., J. Chromatogr., 57, 99 (1971).
136. Kaufmann H. P., Viswanathan C. V., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 607 (1963).
137. Phillips B. M., Robinson N., Clin. Chim. Acta, 8, 832 (1963).
138. Vioque E., Holman R. T., J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 63 (1962).
139. Parker F., Rauda V., Morrison W. H., J. Chromatogr., 34, 35 (1968).
140. Nelson G. J., "Quantitative Analysis of Blood Lipids", in Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitative, Composition, and Metabolism, G. J. Nelson, Ed., Wiley-Interscience, New York, 1972, p. 51.
141. Yamamoto A., Rouser G., Lipids, 5, 442 (1970).
142. Neskovič N., Sarlieve L., Nussbaum J. L., Kostic D., Mandel P., Clin. Chim. Acta, 38, 147 (1972).
143. Harris J., Klingman J. D., J. Neurochem., 19, 1267 (1972).
144. Sankoff I., Sourkes T. L., Can. J. Biochem. Physiol., 41, 1381 (1963).
145. Sahasrabudhe M. R., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 47, 888 (1964).
146. Rutkowski A., Kozłowska H., Szerszynski J., Roczn. Panstw. Zakł. Hig., 14, 361 (1963).
147. Bang H. O., J. Chromatogr., 14, 520 (1964).
148. Bernauer W., Schmidt L., Arch. Ex. Pathol. Pharmacol., 246, 68 (1963).
149. Frosh B., Wagener H., Klin. Wochenschr., 42, 901 (1964).
150. Struck H., Mikrochim. Acta, 1961, 634.
151. Bičan-Fišter T., J. Chromatogr., 22, 465 (1966).
152. Luisi M., Fassorra C., Levanti C., Franchi F., J. Chromatogr., 58, 213 (1971).
153. Grunbaum B. W., Pace N., Microchem. J., 15, 103 (1970).
154. Bičan-Fišter T., Merkaš J., J. Chromatogr., 41, 91 (1969).
155. Bruinvels J., Experimentia, 19, 551 (1963).
156. Mueller K. H., Honerlagen H., Arch. Pharm., 193/65, 202 (1960).
157. Braeckman P., van Severen R., De Jaeger-Van Moeseke L., Pharm. Tijdschr. Belg., 40, 113 (1963); through Chem. Abstr., 60, 1541 (1964).
158. Vannier S. H., Stanley W. L., J. Assoc. Off. Agric. Chem., 41, 432 (1958).
159. Genest K., Farmilo C. G., J. Pharm. Pharmacol., 16, 250 (1964).
160. Kutáček M., Procházková Z., Colloq. Int. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris), 123, 445 (1963, Pub. 1964); through Chem. Abstr., 61, 9760 (1964).
161. Gerstmeier A., Zentr. Pharm., Pharmakother. Laboratoriumsdiagn., 111, 821 (1972); through Anal. Abstr., 24, 1745 (1973).

162. Takahashi S., Gjessing L. R., Clin. Chim. Acta, **36**, 369 (1972).
 163. Saglietto G., Mantovani G., Z. Zuckerind., **20**, 17 (1970).
 164. Doss M., Z. Klin. Chem. Biochem., **8**, 208 (1970).
 165. Doss M., Look D., Henning H., Lueders G. J., Doelle W., Strohmeier G., Z. Klin. Chem. Biochem., **9**, 471 (1971).
 166. Vioque E., Morris L. J., Holman R. T., J. Am. Oil Chem. Soc., **38**, 489 (1961).
 167. Angelelli L., Cavina G., Moretti G., Siniscalchi P., Farmaco Ed. Prat., **21**, 493 (1966).
 168. Huang J. S., Downes G. L., Belzer F. O., J. Lipid Res., **12**, 622 (1971).
 169. Мицнер Б. И., Сырцова М. С., Копылов В. М., Звонкова Е. М., Андришинов К. А., Журнал общей химии, **40**, 942 (1970).
 170. Bazzi B., Fabbrini R., Radice M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., **54**, 1313 (1971).
 171. Preininger V., Cross A. D., Murphy J. W., Santavy F., Toube T., Collec. Czech. Chem. Commun., **34**, 875 (1969).
 172. Potešilová H., Santavý H., El-Hamidi A., Santavý F., Collect. Czech. Chem. Commun., **34**, 3540 (1969).
 173. Steuerle H., Pfab W., Dtsch. Lebensm.-Rundsch., **65**, 113 (1969).
 173a. Koenig H., Z. Anal. Chem., **251**, 359 (1970).
 173b. Procházka Z., Nguyen Gia Chan, Collect. Czech. Chem. Commun., **35**, 2209 (1970).
 174. Vaciková A., Felt V., Maliková J., J. Chromatogr., **9**, 301 (1962).
 175. Ikram M., Baksh M. K., Anal. Chem., **36**, 111 (1964).
 176. Pastuska G., Z. Anal. Chem., **179**, 427 (1961).
 177. Dobici F., Grassini G., J. Chromatogr., **10**, 98 (1963).
 177a. Boardmen W., Warren B., Proc. Soc. Anal. Chem. Conf., Nottingham, England, **1965**, 151.
 178. Crizér E., Goeroeg S., J. Chromatogr., **76**, 502 (1973).
 179. Udris J., Analyst (London), **96**, 130 (1971).
 180. Wijne J. J. A., Bletz E., Frijns J. M., Pharm. Weekbl., **102**, 959 (1967).
 181. Vukcevic-Kovacevic V., Seremet S., Bull. Sci. Conseil Acad. RPF Yougosl., **14**, 377 (1969).
 182. Bowyer D. E., Leat W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A., Biochem. J., **89**, 24P (1963).
 183. Bowyer D. E., Leat W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A., Biochim. Biophys. Acta, **70**, 423 (1963).
 184. Nichaman M. Z., Sweeley C. C., Oldham N. M., Olson R. E., J. Lipid Res., **4**, 484 (1963).
 185. Futterweit W., McNiven N. L., Narcus L., Lantos C., Drosdowsky M., Dorfman R. I., Steroids, **1**, 628 (1963).
 186. Guerra-Garcia R., Chaitoraj S. C., Gabrilove L. J., Wotiz H. H., Steroids, **2**, 605 (1963).
 187. Hoffsommer J. C., J. Chromatogr., **51**, 243 (1970).
 188. Volke J., Oelschlaeger H., Sci. Pharm. Proc., 25th 1965, **2**, 105 (1966).
 189. Kotarski A., Mosinska K., Chem. Anal. (Warsaw), **12**, 329 (1967).
 189a. Kováč J., J. Chromatogr., **11**, 412 (1963).
 190. 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.
 191. Huber W., Chromatographia, **1**, 212 (1968).
 191a. Fike R. R., nar. CIIIA 3752744 (August 14, 1973).
 192. Pollak V., Boulton A. A., J. Chromatogr., **72**, 231 (1972).
 193. Varga J. M., Richards F. F., Anal. Biochem. **53**, 397 (1973).
 194. Ripphahn J., Halpaap H., J. Chromatogr., **112**, 81 (1975).
 195. Touchstone J. C., Levine S. S., Muravec T., Anal. Chem., **43**, 858 (1971).
 196. Pataki G., Wang K.-T., J. Chromatogr., **37**, 499 (1968).
 197. Seiler M., Weichmann M., Z. Anal. Chem., **220**, 109 (1966).
 198. Janchen D., Pataki G., J. Chromatogr., **33**, 391 (1968).
 199. Smith B. R., J. Chromatogr., **82**, 95 (1973).
 200. Segura R., Gotto A. M., Jr., J. Chromatogr., **99**, 643 (1974).
 201. Houpt P. M., X-Ray Spectrom., **1**, 37 (1972).
 202. Libby R. A., Anal. Chem., **40**, 1507 (1968).
 203. Chapman L. R., J. Chromatogr., **66**, 303 (1972).
 204. Alter J., Diehlmann D., Beydatsch R., Kohler P., Quass D., Spichale W., Z. Anal. Chem., **233**, 188 (1968).
 205. Ebel S., Herold G., Z. Anal. Chem., **266**, 281 (1973).
 206. Connors W. M., Boak W. K., J. Chromatogr., **16**, 243 (1964).
 207. Sattler L., Zerban F. W., Anal. Chem., **24**, 1862 (1952).
 208. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
 209. Pataki G., Chromatographia, **1**, 492 (1968).
 210. Frodyma M. M., Frei R. W., Williams D. J., J. Chromatogr., **13**, 61 (1964).
 211. Dallas M. S. J., J. Chromatogr., **33**, 337 (1968).
 212. Frei R. W., J. Chromatogr., **64**, 285 (1972).
 213. Jork H., J. Chromatogr., **48**, 372 (1970).
 214. Treiber L. R., Nordberg R., Lindstedt S., Stoellnberger P., J. Chromatogr., **63**, 211 (1971).
 215. Jork H., J. Chromatogr., **82**, 85 (1973).
 216. Hezel U., Chem. Int. Ed. Engl., **12**, 298 (1973).
 217. Zuercher H., Pataki G., Boroko J., Frei R. W., J. Chromatogr., **43**, 457 (1969).
 218. Ebel S., Herold G., Chromatographia, **8**, 35 (1975).
 219. Yamamoto H., Kurita T., Suzuki J., Hira R., Nakano K., Makabe H., Shibata K., J. Chromatogr., **116**, 29 (1976).
 220. Bethke H., Santi W., Frei R. W., J. Chromatogr., **12**, 392 (1974).
 221. Lieu V. T., Frodyma M. M., Talanta, **13**, 1319 (1966).
 222. Ebel S., Herold G., Z. Anal. Chem., **270**, 19 (1974).
 223. Kynast G., Chromatographia, **3**, 425 (1970).
 224. Frei R. W., "Reflectance Spectroscopy in Thin-Layer Chromatography", in Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. II, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 1.
 225. Hara S., Takeuchi M., Tachibana M., Chichrara G., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **12**, 483 (1964).
 226. Dallas M. S. J., J. Chromatogr., **33**, 337 (1968).
 227. Shellard E. J., Alam M. Z., J. Chromatogr., **33**, 347 (1968).
 228. Neskovic N. M., Arch. Inst. Pasteur Tunis, **43**, 513 (1966).
 229. Thomas A. E., III, Scharoun J. E., Ralston H., J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 789 (1965).
 230. Blank M. L., Schmit J. A., Privett O. S., J. Am. Oil Chem. Soc., **41**, 371 (1964).
 231. Turano P., Turner W. J., J. Chromatogr., **64**, 347 (1972).
 232. Waksmundzki A., Rózylo J. K., J. Chromatogr., **78**, 55 (1973).
 233. Bethke H., Frei R. W., J. Chromatogr., **91**, 433 (1974).
 234. Treiber L. R., Oertengren B., Lindsten R., Oertegren T., J. Chromatogr., **73**, 151 (1972).
 235. Treiber L. R., J. Chromatogr., **69**, 399 (1972).
 236. Treiber L. R., J. Chromatogr., **160**, 123 (1974).
 237. Salganicoff L., Kraybill M., Mayer D., Legallais V., J. Chromatogr., **26**, 434 (1967).
 238. Chance B., Rev. Sci. Instr., **22**, 619 (1951).
 239. Chance B., in Methods in Enzymology, Vol. 12, S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Eds., Academic Press, New York, 1957, p. 273.
 240. Pollak V., J. Chromatogr., **63**, 145 (1971).

241. Boulton A. A., Pollak V., *J. Chromatogr.*, **63**, 75 (1971).
 242. Turina S., Kastelan-Macan M., *J. Chromatogr.*, **48**, 35 (1970).
 243. Goldman J., Goodall R. R., *J. Chromatogr.*, **40**, 345 (1969).
 244. Goldman J., Goodall R. R., *J. Chromatogr.*, **47**, 386 (1970).
 245. Goodall R. R., *J. Chromatogr.*, **78**, 153 (1973).
 246. Goodall R. R., *J. Chromatogr.*, **103**, 265 (1975).
 247. Ebel S., Kussmaul H., *Z. Anal. Chem.*, **268**, 268 (1974).
 248. Ebel S., Kussmaul H., *Z. Anal. Chem.*, **269**, 10 (1974).
 249. Ebel S., Herold G., *Z. Anal. Chem.*, **270**, 19 (1974).
 250. Owen J. M., *J. Chromatogr.*, **79**, 165 (1973).
 251. Franck A., *Chem.-Ztg.*, **92**, 115 (1969).
 252. Ebel S., Hocke J., *Chromatographia*, **9**, 78 (1976).
 253. Zeineh R. A., Nijm W. P., Al-Azzawi F. H., *Am. Lab.*, **7**, 51 (1975).
 254. Hefendeht F. W., *Planta Med.*, **8**, 65 (1960).
 255. Rybicka S. M., *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 1947.
 256. Rasmussen H., *J. Chromatogr.*, **27**, 142 (1967).
 257. Blank M. L., Schmit J. A., Privett O. S., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 371 (1964).
 258. Vioque E., Vioque A., *Grasas Aceites (Seville, Spain)*, **15**, 125 (1964).
 259. Kelleher P. C., *J. Chromatogr.*, **52**, 437 (1970).
 260. Siakotos A. N., Rouser G., *Anal. Biochem.*, **14**, 162 (1966).
 261. Jacobsohn G. M., *Anal. Chem.*, **36**, 2030 (1964).
 262. Goodall R. R., *J. Chromatogr.*, **123**, 5 (1976).
 262a. Pollak V., *J. Chromatogr.*, **123**, 11 (1976).
 263. Treiber L. R., *J. Chromatogr.*, **123**, 23 (1976).
 264. Wright J., *Chem. Ind. (London)*, **1963**, 1125.
 265. Castagnola V., *Boll. Chim. Farm.*, **102**, 784 (1963).
 266. Groeger D., Tyler V. E., Jr., Dusenberry J. E., *Lloydia*, **24**, 97 (1961).
 267. Hohmann T., Rochelmeyer H., *Arch. Pharm.*, **297**, 186 (1964).
 268. Nuernberg E., *Arch. Pharm.*, **292/64**, 610 (1959).
 269. Harthon J. G. L., *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1401 (1961).
 270. Гурвич Н. И., Всесоюзный научно-исследовательский институт масличн. и эфиромасличн. культур. Всесоюзная академия с.-х. наук, краткий отчет, **1956**, 154.
 271. Stahl E., *Chem.-Zig.*, **82**, 323 (1958).
 272. Tyihak E., Sárkaňy-Kiss I., Máthe J., *Pharm. Zentralhalle*, **102**, 128 (1963).
 273. Waldi D., *Arch. Pharm.*, **295**, 125 (1962).
 274. Winterstein A., Hegedues B., *Z. Physiol. Chem.*, **312**, 97 (1960).
 275. Vuilleumier J. P., Brubacher G., Kalivoda M., *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2983 (1963).
 276. Nussbaumer P. A., *Pharm. Acta Helv.*, **37**, 161 (1962).
 277. Bernauer W., Schmidt L., Ullman G., *Med. Exp.*, **9**, 191 (1963).
 278. Van Dam M. J. D., De Kleuver G. J., de Heus J. G., *J. Chromatogr.*, **4**, 26 (1960).
 279. Waldi D., *Lab. Sci. (Milan)*, **11**, 81 (1963).
 280. Honegger C. G., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 2020 (1962).
 281. Meyer H., *Rev. Int. Chocolat.*, **17**, 270 (1962).
 282. Van Dam M. J. D., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **70**, 122 (1961).
 283. Kovacs M. F., Jr., *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, **46**, 884 (1963).
 284. Radler F., Grncarevic M. V., *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 266 (1964).
 285. Kuenzi P., inaugural dissertation, Basel University, 1962.
 286. Seikel M. K., Millett M. A., Saeman J. F., *J. Chromatogr.*, **15**, 115 (1964).
 287. Seiler H., *Helv. Chim. Acta*, **46**, 2629 (1963).
 288. Oswald N., Flueck H., *Pharm. Acta Helv.*, **39**, 293 (1964).
 289. Petrowitz H.-J., *Mitt. Dtsch. Ges. Holzforsch.*, **48**, 57 (1961).
 290. Seher A., *Mikrochim. Acta*, **1961**, 308.
 291. Seher A., *Nahrung*, **4**, 466 (1960).
 292. Brenner M., Niederwieser A., *Experientia*, **16**, 378 (1960).
 293. Aurenge J., DeGeorges M., Normand J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 1732.
 294. Purdy S. J., Truter E. V., *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 506.
 295. Purdy S. J., Truter E. V., *Analyst*, **87**, 802 (1962).
 296. Nybom N., *J. Chromatogr.*, **28**, 447 (1967).
 297. Broadbent J. H., Cornelius J. A., Shone G., *Analyst (London)*, **88**, 214 (1963).
 298. Hasselquist H., Jaarma M., *Acta Chem. Scand.*, **17**, 529 (1963).
 299. Lagoni H., Wortmann A., *Milchwissenschaft*, **11**, 206 (1956).
 299a. Pilný J., Svojková E., Juřicová M., Deyl Z., *J. Chromatogr.*, **78**, 161 (1973).
 300. Brodasky T. F., *Anal. Chem.*, **35**, 343 (1963).
 301. Peterson C. A., Edgington L. V., *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 898 (1969).
 302. Horton E. W., Thompson C. J., *Brit. J. Pharmacol.*, **22**, 183 (1964).
 303. Kaldewey H., Stahl E., *Planta*, **62**, 22 (1964).
 304. Collet G., *Compt. Rend.*, **259**, 871 (1964).
 305. Dubouchet J., Pilet P.-E., *Ann. Physiol. Veg.*, **5**, 175 (1963).
 306. Cima L., Mantovan R., *Farm. (Pavia), Ed. Prat.*, **17**, 473 (1962).
 307. Salo T., Salminen K., Fiskari K., *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, **117**, 369 (1962).
 308. Billow J., Speaker T. J., *J. Chromatogr.*, **67**, 191 (1972).
 309. Mangold H. K., Kammereck R., Malins D. C., *Microchem. J., Symp. Ser.* **1961**, 2, 697 (1962).
 310. Vermeulen A., Verplancke J. C. M., *Steroids*, **2**, 453 (1963).
 311. Schulze P.-E., Wenzel M., *Angew. Chem., Int. Ed., Engl.*, **1**, 580 (1962).
 312. Wenzel M., Schulze P.-E., Tritium-Markierung, de W. de Gruyter, Berlin, **1962**, 176 pp.
 313. Snyder F., "Thin-Layer Radiochromatography and Related Procedures", in *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*, Vol. 1, A. Niederwieser, G. Pataki, Eds., Ann. Arbor Science, Ann Arbor, **1970**, p. 53.
 314. Catch J. R., *Purity and Analysis of Labeled Compounds*, U. K. Atomic Energy Authority, Radiochemistry Centre, **1968**, 24 pp.
 315. Figge K., Pictet H., Ossenbrueggen H., *Glas-Instrum.-Tech.*, **14**, 900, 907, 913, 1013, 1019, 1025 (1970).
 316. Koss F. W., Jerchel D., *Radiochim. Acta*, **3**, 220 (1964).
 317. Schwane R. A., Nakon R. S., *Anal. Chem.*, **37**, 315 (1965).
 318. Wilson A. T., Spedding D. J., *J. Chromatogr.*, **18**, 76 (1965).
 319. Chamberlain J., Hughes A., Rogers A. W., Thomas G. H., *Nature*, **201**, 774 (1964).
 320. Tio C. O., Sisenwine S. F., *J. Chromatogr.*, **48**, 555 (1970).
 321. Prescott K. M., David G. S., *Anal. Biochem.*, **57**, 232 (1974).
 322. Randerath K., *Anal. Chem.*, **41**, 991 (1969).
 323. Randerath K., *Anal. Biochem.*, **34**, 188 (1970).
 324. Prydz S., Melo T. B., Eriksen E. L., Koren J. F., *J. Chromatogr.*, **47**, 157 (1970).
 325. Prydz S., Melo T. B., Koren J. F., *Anal. Chem.*, **45**, 2106 (1973).
 326. Prydz S., Meloe T. B., Koren J. F., Eriksen E. L., *Anal. Chem.*, **42**, 156 (1970).
 327. Wilson A. T., Spedding D. J., *J. Chromatogr.*, **18**, 76 (1965).
 328. Breccia A., Spalletti F., *Nature*, **198**, 756 (1963).
 329. Rosenberg J., Bolgar M., *Anal. Chem.*, **35**, 1559 (1963).
 330. Rosenberg J., Bolgar M., *Anal. Chem.*, **35**, 1559 (1963).
 331. Ravenhill J. R., James A. T., *J. Chromatogr.*, **26**, 89 (1967).
 332. Snyder F., *Advances in Tracer Methodology*, Vol. 4, Plenum, New York, **1968**, p. 81.

333. Snyder F., *Isotope Radiat. Technol.*, **6**, 381 (1969).
 334. Prydz S., *Anal. Chem.*, **45**, 2317 (1973).
 335. Csallany A. S., Draper H. H., *Anal. Biochem.*, **4**, 418 (1962).
 336. Moghissi A., *J. Chromatogr.*, **13**, 542 (1964).
 337. Redgwell R. J., Turner N. A., Bielecki R. L., *J. Chromatogr.*, **88**, 25 (1974).
 338. Squibb R. L., **198**, 317 (1963).
 339. Arnoff S., *Nucleonics*, **14**, 92 (1956).
 340. Gilbert G. W., Keene J. P., *Radioisotopes Sci. Res., Proc. Int. Conf. Paris*, **1**, 698 (1957).
 341. Wenzel M., Hoffmann K., *Anal. Biochem.*, **44**, 97 (1971).
 342. Hariharan P. V., Poole G., Johns H. E., *J. Chromatogr.*, **32**, 356 (1968).
 343. Prydz S., Melo T. B., Koren J. F., *J. Chromatogr.*, **59**, 99 (1971).
 344. Seim T. O., Prydz S., *J. Chromatogr.*, **73**, 183 (1973).
 345. Lowe A. E., "Bidimensional Radiochromatogram Scanning", in *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, E. J. Shellard, Ed., Academic Press, London, 1968, p. 119.
 346. Wedzicha B. L., *J. Chromatogr.*, **101**, 79 (1974).
 347. Tykva R., *Advances in Physical and Biological Radiation Detectors. International Atomic Energy Agency, Vienna*, 1971, p. 211.
 348. Tykva R., *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.*, No. 301, 455 (1973).
 349. Tykva R., Votruba I., *J. Chromatogr.*, **93**, 399 (1974).
 350. Pullan B. R., "The Evaluation of Radiochromatograms Using a Spark Chamber", in *Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography*, E. J. Shellard, Ed., Academic Press, London, 1968, p. 128.
 351. Brown J. L., Johnston J. M., *J. Lipid Res.*, **3**, 480 (1962).
 352. Riordell A., Tait J. F., Gut M., Tait S. A. S., Joachim E., Little B., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **23**, 620 (1963).
 353. Rivlin R. S., Wilson H., *Anal. Biochem.*, **5**, 267 (1963).
 354. Roucayrol J.-C., Taillandier P., *Compt. Rend.*, **256**, 4653 (1963).
 355. Seno S., Kessler W. V., Christian J. E., *J. Pharm. Sci.*, **53**, 1101 (1964).
 356. Snyder F., Stephens N., *Anal. Biochem.*, **4**, 128 (1962).
 357. Manning R., Brindley D. N., *Biochem. J.*, **130**, 1003 (1972).
 358. Mookerjee S., Cole D. E. C., Chow A., Letts P., *Can. J. Biochem.*, **50**, 1094 (1972).
 359. Snyder F., *Sep. Sci.*, **1**, 655 (1966).
 360. Snyder F., Alford T. J., Kimble H., *U.S. At. Energy Comm. ORINS Rep.*, **44**.
 361. Snyder F., Kimble H., *U.S. At. Energy Comm. ORINS Rep.*, **47**.
 362. Snyder F., "Liquid Scintillation Radioassay of Thin-Layer Chromatograms", in *Current Status of Liquid Scintillation Counting*, E. D. Bransome, Jr., Ed., Grune and Stratton, New York, 1970, p. 248.
 363. Fosslie E., Musil F., Domizi D., Blickenstaff L., Luming J., *J. Chromatogr.*, **63**, 131 (1971).
 364. Krichevsky M. I., Zaveler S. A., Bulkeley J., *Anal. Biochem.*, **22**, 442 (1968).
 365. Boeckx R. L., Protti D. J., Dakshinamurti K., *Anal. Biochem.*, **53**, 491 (1973).
 366. Gruenstein E., Smith T. W., *Anal. Biochem.*, **61**, 429 (1974).
 367. Shaw W. A., Harlan W. R., Bennett A., *Anal. Biochem.*, **43**, 119 (1971).
 368. Bollinger J. N., Mallow W. A., Register J. W., Jr., Johnson D. E., *Anal. Chem.*, **39**, 1508 (1967).
 369. Baker J. T., *Chemical Company, Chemist-Analyst*, **65**, 2 (1976).
 370. Griffiths M. H., Mallinson A., *Anal. Biochem.*, **22**, 465 (1968).
 371. Hahti E., Vihko R., Jaakonmaeki I., *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 370 (1970).
 372. Scheig R. L., Annunziata R., Pesch L. A., *Anal. Biochem.*, **5**, 291 (1963).

373. Imai Y., Yamauchi K., Terabe S., Konaka R., Sugita J., *J. Chromatogr.*, **36**, 545 (1968).
 374. Paik N. H., Kim B. K., Yakhak Hoeji, **13**, 84 (1969); through *Chem. Abstr.*, **73**, 1812k (1970).
 375. Konaka R., Terabe S., *J. Chromatogr.*, **24**, 236 (1966).
 376. Tsujino Y., Imai Y., Yamauchi K., Sugita J., *J. Chromatogr.*, **42**, 419 (1969).
 377. Cotgreave T., Lynes A., *J. Chromatogr.*, **30**, 117 (1967).
 378. Padley F. B., *Chem. Ind. (London)*, **1967**, 874.
 379. Padley F. B., *J. Chromatogr.*, **39**, 37 (1969).
 380. Szakasits J. J., Peurifoy P. V., Woods L. A., *Anal. Chem.*, **42**, 351 (1970).
 381. Hahti E., Jaakonmaki J., *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, **47**, 175 (1969).
 382. Mukherjee K. D., Spaans H., Hahti E., *J. Chromatogr.*, **61**, 317 (1971).
 383. Mukherjee K. O., Spaans H., Hahti E., *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 193 (1972).
 384. Mukherjee K. D., *J. Chromatogr.*, **96**, 242 (1974).
 385. Mangold H. K., Mukherjee K. D., *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 398 (1975).
 386. Kaufmann E. H. P., Mukherjee K. D., *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **71**, 11 (1969).

КОМБИНИРОВАНИЕ ТСХ С ДРУГИМИ МЕТОДАМИ

1. КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ТСХ используют при выборе оптимальной комбинации растворителя и адсорбента для конкретного колоночного разделения. После начала колоночного опыта элюент быстро проверяют методом ТСХ так, что к моменту завершения разделения фракции с аналогичными компонентами можно объединить. Эта методика, которую тщательно разработали Миллер и Кирхнер [1], описана в гл. X и пояснена рис. 10.3. По такой комбинированной методике, сочетающей ТСХ с колоночной хроматографией, разделено много различных типов соединений; в настоящее время опубликовано большое число статей, в которых рассматриваются конкретные примеры применения данной методики.

Ван Дийк [2] объединил колоночную хроматографию непосредственно с ТСХ, используя для этого делитель потока с переменным коэффициентом деления для регулирования доли элюата, подаваемого из колонки на пластинку.

Методом ТСХ подбирают растворители для высокоэффективной жидкостной хроматографии и оптимизируют условия разделения [3—6]. Фирма САМАГ выпускает оборудование, специально предназначенное для таких работ (см. гл. V, разд. 4).

2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Существует ряд методов, в которых ТСХ успешно сочетают с газовой хроматографией. Пятна, полученные методом ТСХ, элюируют, концентрируют и анализируют методом газовой хроматографии. Таким способом Икеда и др. [7, 8] анализировали цитрусовые и другие эфирные масла [9], а Морис и др. [10] — эфиры ненасыщенных оксикислот. Личфилд и др. [11] разделяли триглицериды в соответствии с числом двойных связей на тонких слоях кремневой кислоты, пропитанных нитратом серебра, а далее уже методом газовой хроматографии разделяли соединения, входящие в одну фракцию, по молекулярным массам. Таким методом проведено разделение витаминов [12, 13], азогетероциклических соединений [14], пестицидов [15, 16] и полярных углеводов [17].

Янак [18] объединил центростремительную ТСХ с газовой хроматографией, проводя анализ микроколичеств линдана в экстрактах капусты. Элюаты, полученные после разделения методом центростремительной ТСХ, анализировали далее методом ГХ.

Андерсон и др. [19] использовали ТСХ для отделения продуктов окисления БОА (3-трет-бутил-4-оксианизола) и БОТ (3,5-ди-трет-бутил-4-окситолуола) в овсяных или кукурузных хлопьях для завтрака от мешающих определению жиров; продукты окисления можно было импульсно вводить в газовую колонку.

Янак [20] проводил разделение сначала методом ГХ, далее ТСХ и затем опять ГХ. Таким образом, фракции, полученные после первого газохроматографического разделения, он анализировал методом ТСХ и выделенные фракции вновь разделял газохроматографическим методом. Этот метод особенно удобен для анализа высококипящих соединений.

Фракции, полученные после разделения на хроматографических пластинках, перед газохроматографическим анализом можно также подвергнуть химической обработке. При этом моно- и диглицериды липолизированного молочного жира после извлечения с тонкослойных пластинок перед газохроматографическим анализом переводили в метиловые и бутиловые эфиры. Такая методика использовалась при анализе липидов тканей [21, 22]. Малинс [23] отделял алкоксидиглицериды от других липидов на тонких слоях кремневой кислоты, после чего проводил омыление и метилирование; в результате такой обработки образовывались метиловые эфиры жирных кислот и глицериды. Метиловые эфиры определяли газохроматографически. Глицериды вначале окисляли и образовавшиеся альдегиды разделяли газохроматографически. Прайвет и сотр. [24—27] анализировали ненасыщенные метиловые эфиры жирных кислот. С этой целью их предварительно разделяли по степени ненасыщенности на силикагеле, пропитанном нитратом серебра. Выделенные фракции элюировали и обрабатывали, подвергая восстановительному озонолу; образовавшиеся при этом осколки анализировали газохроматографически, используя пламенно-ионизационный детектор. Метод детально описан в разделе, посвященном сложным метиловым эфирам (см. «Липиды»).

Липиды можно перевести в их метиловые эфиры обработкой раствором трифторида бора в метаноле [28] или же можно получить триметилсилильные производные липидов [29, 30]. Гедам и др. [31] отделяли методом ТСХ метиловые эфиры жирных кислот от сардинового масла, гидрировали фракции и разделяли методом ГХ.

Стероиды разделяют на фракции методом ТСХ [32, 33], далее получают их триметилсилильные производные, которые анализируют методом ГХ. Стероиды также можно анализировать и в виде ацетильных производных [34]. Многие смеси стероидов содержат трудноразделяемые изомеры, и полное их разделение возможно только при сочетании методов ТСХ и ГХ, которые хорошо дополняют друг друга [35]. Лисбоа [36] наглядно показал, что сочетание ТСХ с газовой хроматографией и масс-спектрометрией незаменимо для полной идентификации стероидов.

Определяя субнанограммовые количества карденолидов, Уотсон и др. [37] первоначально разделяли их методом ТСХ на фракции. Эти фракции обрабатывали ангидридом гептафтормасляной кислоты, чтобы получить гептафторпроизводные, которые анализировали методом ГХ, используя электроно-захватный детектор.

Морис [38] разделял эфиры холестерина на тонких слоях, пропитанных нитратом серебра. Отдельные фракции он переводил переметилированием в соответствующие сложные метиловые эфиры и затем анализировал газохроматографически.

Мангольд и Каммерек [39] при разделении метиловых эфиров жирных кислот использовали комбинацию методов. Сначала они методом ТСХ удаляли эфиры гидроксилированных кислот, обычно мешающих газохроматографическому разделению. Далее очищенные эфиры обрабатывали ацетатом ртути, чтобы получить ацетоксиртутные производные ненасыщенных эфиров. Эти эфиры они разделяли по степени ненасыщенности на тонких слоях кремневой кислоты и выделенные фракции анализировали газохроматографически. Пары сложных эфиров, не разделяющихся газохроматографически, можно проанализировать методом ТСХ, разделяя их ртутные производные (и наоборот). Енсен и Сампунья [40] использовали этот метод для идентификации жирных кислот молока.

Авторы работ [41—44] применяли обратную методику — исследование газохроматографических фракций методом ТСХ.

Де Клейн [45] несколько иначе проводил количественное определение фракций, выделенных на тонких слоях. Он соскребал пятна с пластинок ТСХ в ампулы, которые затем вводил в дозирующее устройство газового хроматографа, снабженное приспособлением для разрушения ампул. При хроматографировании с программированием температуры выход продуктов составлял 96—100%. Вероятность потери пробы в данном случае невелика, на хроматограмме не появляются пики растворителя, мешающие анализу, а запаянные ампулы удобно хранить. Франк и Ченкирова [46] соскребали адсорбент, содержащий анализируемое соединение, непосредственно в газовую

реакционную камеру, а газообразный продукт реакции анализировали газохроматографически.

В другом варианте, также предусматривающем сочетание ТСХ с газовой хроматографией, элюируемые соединения из выходной трубки газового хроматографа непосредственно направляли на тонкослойную пластинку. Казу и Кавалотти [47] первыми описали такую методику анализа. С помощью мотора и системы шестерен хроматографическую полосу протягивали под выходной трубкой на расстоянии 1 мм от нее. Скорость перемещения полоски была равна скорости протяжки ленты самопишущего потенциометра. Однако на этих полосках не проводилось хроматографирование как таковое, они использовались лишь для локализации специальных типов соединений. Например, алифатические и ароматические углеводороды локализовали на полосках, смоченных раствором формальдегида в серной кислоте.

Примерно в это же время три независимые группы ученых исследовали возможность непосредственного сочетания ТСХ с газовой хроматографией. Нигем и др. [48] применили этот метод для анализа эфирных масел *Menta* и *Eucalyptus*. С этой целью тонкослойную пластинку помещали непосредственно под платиновую иглу (вн. диам. 1 мм), которую втыкали в выходное устройство парофазного хроматографа в тот момент, когда на ленте самописца появлялся хроматографический пик. Хроматографическую пластинку элюировали затем смесью гексан — диэтиловый эфир (10:1).

Янак [49, 50] и Кайзер [51] описали более изящную методику. В этом случае тонкослойную пластинку перемещают под выходной трубкой газового хроматографа. Причем скорость перемещения пластины регулируют так, что элюируемое из колонки соединение наносится на пластинку, движущуюся со скоростью, равной скорости ленты самописца газового хроматографа. Устройство для перемещения пластинки может включаться от самописца, благодаря чему отдельные пики наносятся на пластинку в виде индивидуальных пятен; в это время перемещение пластинки прекращается. Последний метод обеспечивает нанесение более концентрированной пробы. После того как на пластинку нанесены пятна анализируемых проб, хроматограмму элюируют обычным образом. Как указал Кайзер, в ряде случаев обе системы дополняют друг друга, особенно если разделение методом газовой хроматографии основано на различии в относительных летучестях, а разделение методом ТСХ проводится, например, в соответствии с наличием определенных функциональных групп. Янак и др. [52] использовали незакрепленные слои и применяли соединительное устройство, с помощью которого тонкослойную

пластинку перемещали по логарифмическому закону; газовый хроматограф работал при этом в изотермических условиях. В результате идентификации зон в таких условиях можно было использовать индексы удерживания Ковача [53], а также коррелировать положение зон с температурами кипения. Целесообразно

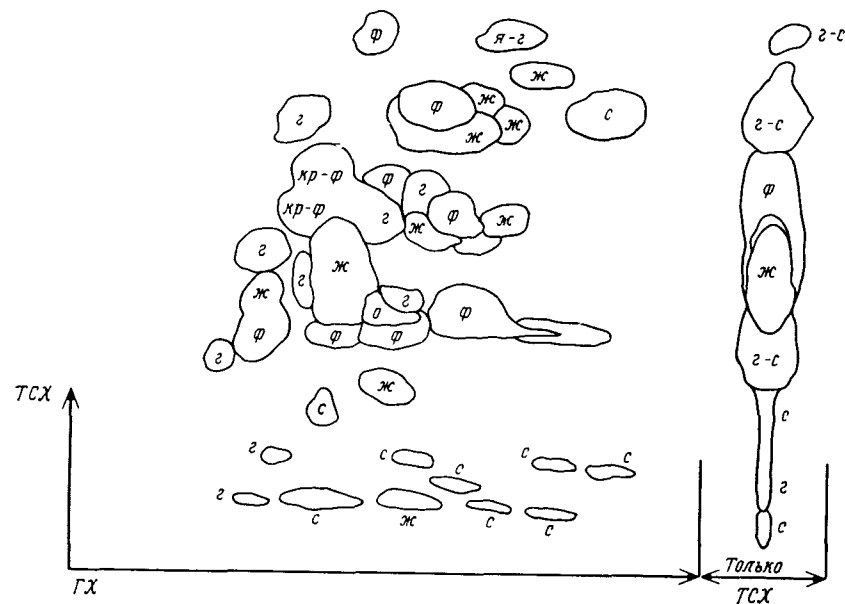


Рис. 12.1. Разделение фракции ксилолов с близкими температурами кипения [51] (с разрешения автора и Springer-Verlag).

Фракция содержит не только серусодержащие соединения, но и нефенольные компоненты. Разделение проведено методом ГХ—ТСХ, контрольные хроматограммы получены методом ТСХ. Обнаружение проведено следующим образом: пластинки обрабатывали дибромхинонхлоримидом и выдерживали в парах сначала аммиака, затем соляной кислоты. Таким способом выделено более 42 компонентов. Цвет пятен: г — голубой, г с — голубовато-серый, ж — желтый, кр-ф — красно-фиолетовый, ф — фиолетовый, я-г — ярко-голубой.

ность сочетания газовой и тонкослойной хроматографии показывает, в частности, рис. 12.1, заимствованный из работы Кайзера [51].

Тамлинсон и др. [54] использовали эту методику для идентификации карбонильных соединений. Элюируемый из газового хроматографа поток направлялся на стартовую линию тонкослойной пластинки, которую затем обрабатывали 2,4-динитрофенилгидразином или другим реактивом на карбонильные группы. Полученные производные подвергали далее хроматографическому разделению. В отличие от авторов [54] Куртиус и Мюллер [55] после адсорбции на силикагелевых пластинках триме-

тилсилиловых эфиров стероидов опрыскивали слои 1 %-ным раствором соляной кислоты в метаноле, чтобы выделить стероиды перед хроматографированием; триметилсилиловые эфиры также подвергали хроматографическому анализу. Паркер и др. [56] объединили в одной установке, предназначенной для судебно-медицинских исследований, газовый хроматограф и прибор ТСХ, что позволило им усовершенствовать методику разделения, а также подтверждать данные о наличии или отсутствии искомого соединения. Кайзер [57] и Янак [58] рассмотрели в общем плане вопрос о возможности объединения ГХ и ТСХ. Хамфри [59] описал оригинальный способ перемещения пластинки: ее прикрепляют к бумажной ленте самописца газового хроматографа, свисающей с края. Фирма SAMAG поставляет устройство Dichome для перемещения тонкослойной пластинки с разными скоростями под выходным отверстием газового хроматографа; это устройство допускает также ступенчатое изменение скорости.

Разработана и другая методика использования ГХ-детекторов, она рассмотрена в гл. XI, разд. 7.

3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрию и ТСХ можно комбинировать непосредственно, поместив, как предлагают Хейнс и Грутцмахер [61], в ионный источник пятна веществ, адсорбированных силикагелем. Фетизон [62] рассмотрел различные примеры применения масс-спектрометрии с разделением, осуществленным методом ТСХ. Деверс и др. [63] описали систему выпуска проб, в которой скорость ввода пробы контролируют, регулируя температуру. Нильсон и др. [64] также описали простое устройство для ввода адсорбента, содержащего пробу, или жидкости (элюированные пробы). Даун и Гвин [65] исследовали параметры, влияющие на результаты масс-спектрометрического анализа адсорбированных лекарственных средств. Размытые пятна проб не всегда удачно размещаются в наконечнике, из которого выходит проба; это подтверждают исследования Хейнса и Грутцмахера [61], показавшие, что порог, ниже которого спектры получаются неудовлетворительными, лежит вблизи точки с соотношением анализируемого соединения и силикагеля, равным 1—2 %. Число и интенсивность фоновых пиков зависят от типа растворителя, использованного для элюирования хроматограммы.

Некоторые растворители дают более интенсивные фоновые пики, что говорит о необходимости тщательной очистки растворителей (см. гл. V, разд. 1). При разделении проб метанолом появляются пики, характерные для фталатных пластификато-

ров; легкие петролиновые эфиры дают интенсивные пики высокомолекулярных углеводородов; хлороформ при температурах ниже 100—150 °С приводит к появлению фоновых пиков с m/e до 100, которые исчезают почти полностью при более высоких температурах. Смеси аммиака с метанолом позволяют работать с очень низкими фоновыми помехами; растворители, содержащие уксусную кислоту, при температуре до 120 °С дают большие фоновые пики с m/e 60 и ниже, интенсивность которых резко снижается с повышением температуры. При температурах проб от 250 до 300 °С все исследованные лекарственные вещества, кроме кодеина и метадона, дают высококачественные спектры. Чтобы снизить нижний предел обнаружения, фоновые спектры можно вычитать из спектра анализируемой пробы. Испарение с силикагеля обычно приводит к исчезновению одного или двух основных пиков, а иногда к появлению одного или двух новых больших пиков.

Можно также элюировать вещества из адсорбента, помещенного в капиллярную трубку, и испарить элюат [66, 67]. Чтобы избавиться от некоторых фоновых пиков, Секели [68] пропускал элюат с помощью капиллярной оттяжки через капилляр, заполненный бромидом калия; это помогает удалить мелкие частицы силикагеля.

Методику ИК-исследований, в которой используют ультрамикротаблетки бромида калия и систему фокусировки луча, можно успешно объединить с ТСХ. Неш и др. [69] использовали, в частности, эту методику для идентификации пятна ротенона на хроматограмме пробы технического ротенона. Пятна на слоях флуоресцирующего силикагеля идентифицировали в УФ-свете, затем соскребали их в центрифужные пробирки и элюировали спектрально чистым этилацетатом. Элюат центрифугировали и осторожно переводили в ампулы из нержавеющей стали (10×30 мм), откуда воздушным потоком удаляли растворитель. Последние следы растворителя удаляли в приборе Абдеральдена, после чего остаток смешивали со спектрально чистым бромидом калия и таблетировали. В работах [70, 71] даны простые методы приготовления микротаблеток бромида калия; Андерсон и Вильсон [72] описали метод приготовления таблеток диаметром от 0,15 до 0,35 мм, используя для штамповки камни для часов. Такие таблетки получают для проб, меньших 0,5 мкм; их используют в микроанализе с применением преобразования Фурье. В этом случае следует обратить особое внимание на предотвращение возможного загрязнения.

Обычно центрифугирование не обеспечивает достаточно полного удаления очень тонких частиц силикагеля. Так, Спенсер и Беггс [73] нашли, что 5-минутное центрифугирование элюата

со скоростью 3000 об/мин не приводит к удалению очень тонких частиц, а 30-минутное высокоскоростное центрифугирование при 10 000 об/мин позволяет эффективно очистить элюат.

Было испробовано несколько методов удаления мелких частиц силикагеля, поскольку некоторые способы приготовления геля приводят к образованию загрязнений, обнаруживаемых по полосам поглощения при 3,4 и 7,2 мкм [74]. Авторы [74] предлагают фильтровать элюат на воронках с пористыми стеклянными фильтрами для ультрафильтрации. Если эта операция ведется с применением высокого вакуума, то она не занимает *слишком* много времени. Спенсер и Беггс [73] установили, что такая методика позволяет очистить элюат, но поскольку фильтры быстро засоряются и их необходимо менять, очистка идет *слишком* медленно. Поэтому эти авторы прибегли к фильтрованию через мембранные фильтры и получили хорошие результаты. Масарахия и Гавьеновский [75] также нашли, что мембранные фильтры весьма эффективны при элюировании проб, и использовали фильтр Альфа-8 Metrical (Gelman) с размерами пор 0,20 мкм в сочетании с устройством для подкожных инъекций (типа Gelman Swinny). Другой метод очистки предполагает фильтрование растворителя через капилляр, заполненный бромидом калия [76]. Амос [77] помещал силикагель, содержащий пятно, сверху слоя бромида калия в конусе иглы для подкожных инъекций. В процессе элюирования вещества и подачи его по каплям на 10-миллиграммовый слой измельченного бромида калия стеклянный шприц емкостью 1 мл, заполненный ацетоном, служил резервуаром. Каждую введенную каплю элюата перед подачей следующей капли испаряли. По окончании элюирования бромид калия тщательно перемешивали и прессовали в виде дисков диаметром полтора миллиметра.

Райс [78] соскребал адсорбент вокруг исследуемого пятна на тонкослойной пластинке, оставляя пятно на поверхности в виде капли. Тщательно протирал кусочком чистого полотна, смоченным летучим растворителем, стекло вокруг этого пятна и на очищенную таким образом поверхность помещал ряд 0,2×0,6 см от 15 до 20 мг спектрально чистого бромида калия так, чтобы порошок касался капли. Далее он по каплям добавлял растворитель, чтобы смыть вещество с пятна в бромид калия. Де Клейн [79] усовершенствовал эту методику, поместив бромид калия полукругом у верхушки капли так, чтобы расстояние между ними составляло 1—2 мм. Гарнер и Пеккер [80] помещали треугольную таблетку бромида калия основанием в элюат. По мере того как растворитель испарялся с вершины таблетки, добавляли свежий растворитель, который подымался вверх, увлекая вместе с собой растворенное вещество.

В заключение вершину таблетки, где концентрировались все вещества, отламывали, измельчали и вновь прессовали в таблетки. Гудмен [81] использовал сходную методику: он прижимал тонкослойную пластинку пятном к основанию треугольного слоя бромида калия, образованного на другой стеклянной пластинке.

Тонкослойные пластинки, предназначенные для работ в ИК-области, следует предварительно элюировать или промывать соответствующим растворителем, чтобы удалить примеси, адсорбированные на слое [82]. Амос [77] изучал возможные источники загрязнений и нашел, что пластмассовые наконечники для вакуумных насосов, поставляемые фирмой Desaga, могут быть причиной появления довольно большого количества примесей. При использовании предварительно покрытых слоев пластинок необходимо убедиться, что связующие вещества не вносят в элюаты загрязнений, поглощающих в ИК-области. Амос исследовал различные растворители и нашел очень чистые растворители, вполне пригодные для исследований в ИК-области, правда, относительно дорогие.

Даже простая перегонка аналитически чистых растворителей улучшает результаты, если используются хорошие реактивы. Стеклянная лабораторная посуда также служит источником загрязнений; ее не удается очистить даже обработкой хромовой или азотной кислотой, горячей каустической содой или, наконец, 24-часовым вымачиванием в 2%-ных водных растворах пяти различных моющих средств. Надлежащей степени очистки удалось достичь, лишь обрабатывая посуду 30 мин в ультразвуковой бане одним из трех детергентов Extran, R.V.S 25 или Desop 75.

Персиваль и Гриффитс [83] наносили адсорбент на пластинки хлорида серебра, что позволило им снимать ИК-спектры непосредственно на пластинках. Эти авторы использовали спектрометр Фурье и регистратор соотношений для компенсации спектральных полос, возникающих из-за наличия слоя адсорбента.

В работах с тонкими слоями была применена также спектроскопия многократного внутреннего отражения. Элюат с пятном перегоняли непосредственно на пластинку [84] или зеркало [85], используемые для измерения отражения. Байерман и Дитц [86] переводили слой силикагеля в летучее соединение, обрабатывая его фторидом водорода. Алюминиевые пластинки, которые служили подложками слою силикагеля, выполняют роль зеркала в отражательной ИК-спектроскопии. Конечно, этот метод непригоден для анализа летучих соединений и соединений, меняющихся под воздействием фторида водорода. Герман и др. [87] применяли для идентификации компонентов смесей многократ-

ную экстракцию растворителями с постепенно увеличивающейся полярностью, сочетая методы ТСХ, спектрометрию многократного внутреннего отражения, масс-спектрометрию и газовую хроматографию. При спектрометрии многократного внутреннего отражения для получения интерпретируемого спектра достаточно 10 мкг вещества.

Адамс и Гарднер [88] исследовали применение КР-спекроскопии для анализа *in situ* тонкослойных хроматограмм. В данном случае в слой силикагеля не вводили связующего, хотя связующим может быть сульфат кальция. Разделение проводили растворителями, образующими более концентрированные пятна. В случае необходимости для улучшения отношения сигнала к шуму применяли метод накопления спектра.

4. СМЕШАННЫЕ КОМБИНАЦИИ

ТСХ в принципе пригодна для проверки результатов разделения, проведенного другими методами, и качества очистки соединений. В частности, ТСХ использовали для проверки состава дистилляционных фракций и степени очистки методом молекулярной перегонки [89] и методом перекристаллизации [90], а также для выяснения состава маточного раствора при перекристаллизации [91]. Вольфром и Гроечке [90] методом ТСХ сразу получали первый затравочный кристалл для рекристаллизации. В некоторых процессах очистки хроматографию на бумаге сочетали с ТСХ. Пайфер и др. [92] определяли методом ТСХ полноту экстракции липидов из тканей рыбы, а Ригби и Бетюн [93] проверяли на хроматографических пластинках состав фракций, полученных противоточной экстракцией. Отт и Гунтер [94] приспособили автоанализатор Technicon для анализа порошка, соскабливаемого с пятен тонкослойных хроматограмм при анализе пестицидов, ингибирующих действие холинэстеразы.

Предложена весьма полезная методика изучения природных и других соединений, в процессе которого пары соединений оседают на тонкослойной пластинке, перемещаемой над пробиркой. Чтобы облегчить удаление менее летучих веществ, через нагреваемую пробирку можно пропускать инертный газ. В качестве газа-носителя можно воспользоваться реакционно-способными газами, например аммиаком или парами воды. Метод этот был назван Шталем методом TAS; Шталь утверждал, что он первый предложил этот метод. Однако первая статья с описанием этой уникальной методики опубликована Роджерсом [96] в 1967 г., и основана она на сублимационной методике Васики и Акизу [97].

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller J. M., Kirchner J. G., Anal. Chem., 24, 1480 (1952).
2. van Dijk J. H., Z. Anal. Chem., 247, 262 (1969).
3. Netting A. G., J. Chromatogr., 53, 507 (1970).
4. Schlitt H., Geiss F., J. Chromatogr., 67, 261 (1972).
5. Amos R., Perry S. G., J. Chromatogr., 83, 245 (1973).
6. Coq B., Nicolas J. P., Lamotte A., Porthault M., J. Chromatogr., 97, 137 (1974).
7. Ikeda R. M., Stanley W. L., Rolle L. A., Vannier S. H., J. Food Sci., 27, 593 (1962).
8. Ikeda R. M., Stanley W. L., Vannier S. H., Rolle L. A., Food Technol., 15, 379 (1961).
9. Ikeda R. M., Stanley W. L., Vannier S. H., Spittler E. M., J. Food Sci., 27, 455 (1962).
10. Morris L. J., Holman R. T., Fontell K., J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 323 (1960).
11. Litchfield C., Farquhar M., Reiser R., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 588 (1964).
12. Touw H. D. M., Kroese B. M. C., Molenaar H. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 55, 622 (1972).
13. Wachs W., Melchert H.-U., Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 67, 221 (1971).
14. Brocco D., Cimmino A., Possanzini M., J. Chromatogr., 84, 371 (1973).
15. Kotakemori M., Kawagisi A., Bunseki Kagaku, 20, 709 (1971), through Chem. Abstr., 75, 709 (1971).
16. Stijve T., Cardinale E., Mitt. Geb. Lebensm. Hyg., 63, 142 (1972).
17. Brocco D., Cantuti V., Cartoni G. P., J. Chromatogr., 49, 66 (1970).
18. Janák J., Martiniú V., Rožičková J., J. Chromatogr., 78, 127 (1973).
19. Anderson R. H., Huntley T. E., Schwecke W. M., Nelson J. H., J. Am. Oil Chem. Soc., 40, 349 (1963).
20. Janak J., Nature, 195, 696 (1962).
21. Bowyer D. E., Leaf W. M. F., Howard A. N., Gresham G. A., Biochem. J., 89, 24P (1963).
22. Dobiasova M., J. Lipid Res., 4, 481 (1963).
23. Malins D. C., Chem. Ind. (London), 1960, 1359.
24. Privett O. S., Blank M. L., Romanus O., J. Lipid Res., 4, 260 (1963).
25. Privett O. S., Nickell E. C., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 72 (1964).
26. Privett O. S., Nickell E. C., J. Lipid Res., 4, 208 (1963).
27. Privett O. S., Nickell C., J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 414 (1962).
28. Moscatelli E. A., Lipids, 7, 268 (1972).
29. Samuelsson K., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 27, 381 (1971).
30. Hirayama O., Matsuda H., Agric. Biol. Chem. (Tokyo), 36, 2593 (1972).
31. Gedam P. H., Subbaram M. R., Aggarwal J. S., Fette, Seifen, Anstrichm., 73, 748 (1971).
32. Futterweit W., McNiven N. L., Narcus L., Lantos C., Drosdowsky M., Dorfman R. I., Steroids, 1, 628 (1963).
33. Guerra-Garcia R., Chatteraj S. C., Gabrilove L. J., Wotiz H. H., Steroids, 2, 605 (1963).
34. Wotiz H. H., Chatteraj S. C., Anal. Chem., 36, 1466 (1964).
35. Berthou F., Bardou L., Floch H. H., J. Chromatogr., 93, 149 (1974).
36. Lisboa B. P., J. Chromatogr., 48, 364 (1970).
37. Watson E., Trammell P., Kalman S. M., J. Chromatogr., 69, 157 (1972).
38. Morris L. J., J. Lipid Res., 4, 357 (1963).
39. Mangold H. K., Kammereck R., Chem. Ind. (London), 1961, 1032.
40. Jensen R. G., Sampugna J., J. Dairy Sci., 45, 435 (1962).
41. Attaway J. A., Wolford R. W., 5th International Symposium on Gas Chromatography, Brighton, England, September, 1964.
42. Demole E., Compt. Rend., 243, 1883 (1956).
43. Gupta A. S., Dev S., J. Chromatogr., 12, 189 (1963).
44. Morris L. J., Holman R. T., Fontell K., J. Lipid Res., 1, 412 (1960).
45. de Klein W. J., Z. Anal. Chem., 249, 81 (1970).
46. Franc J., Senkýřová J., J. Chromatogr., 78, 123 (1973).
47. Casu B., Cavallotti L., Anal. Chem., 34, 1514 (1962).
48. Nigam I. C., Sahasrabudhe M., Levi L., Can. J. Chem., 41, 1535 (1963).
49. Janák J., J. Gas Chromatogr., 1, 20 (1963).
50. Janák J., J. Chromatogr., 15, 15 (1964).
51. Kaiser R., Z. Anal. Chem., 205, 284 (1964).
52. Janák J., Klimeš I., Hána K., J. Chromatogr., 18, 270 (1965).
53. Kováts E., Z. Anal. Chem., 181, 351 (1961).
54. Tumlinson J. H., Mynyard J. B., Hedin P. A., Thompson A. C., J. Chromatogr., 29, 80 (1967).
55. Curtius H.-C., Mueller M., J. Chromatogr., 32, 222 (1968).
56. Parker K. D., Wright J. A., Hine C. H., Forensic Sci. Soc. J., 7, 162 (1967).
57. Kaiser R., "Gas Chromatography and Thin-Layer Chromatography" in Ancillary Techniques of Gas Chromatography, L. S. Ettre and W. H. McFadden, Eds., Wiley-Interscience, New York, 1969, p. 299.
58. Janák J., "Two-Dimensional Chromatography Using Gas Chromatography and Related Methods", Vol. II, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 63.
59. Humphrey A. M., J. Chromatogr., 53, 375 (1970).
60. Janák J., Martinů V., Růžičková J., J. Chromatogr., 78, 127 (1973).
61. Heyns K., Gruetzmacher H. F., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1, 400 (1962).
62. Fetizon M., "Spectrometrie de Masse et Chromatographie en Couche Mince", in Thin-Layer Chromatography, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 69.
63. Deverse F. T., Gripsstein E., Lesoine L. G., Inst. News, 18, 16 (1967).
64. Nilsson C.-A., Norstroem A., Andersson K., J. Chromatogr., 73, 270 (1972).
65. Down G. J., Gwyn S. A., J. Chromatogr., 103, 208 (1975).
66. Clark R. L., Chem. Ind. (London), 1971, 1434.
67. Rix M. J., Webster B. R., Wright I. C., Chem. Ind. (London), 1969, 452.
68. Székely G., J. Chromatogr., 48, 313 (1970).
69. Nash N., Allen P., Bevenue A., Beckman H., J. Chromatogr., 12, 421 (1963).
70. de Klein W. J., Uibert K., Anal. Chem., 41, 682 (1969).
71. Bissett F., Bluhm A. L., Long L., Jr., Anal. Chem., 31, 1927 (1959).
72. Anderson D. H., Wilson T. E., Anal. Chem., 47, 2482 (1975).
73. Spencer R. D., Beggs B. H., J. Chromatogr., 21, 52 (1966).
74. Graselli J. G., Snavey M. K., Progr. Infrared Spectrosc., 3, 55 (1967).
75. Masaracchia R. A., Gawienowski A. M., Steroids, 11, 718 (1968).
76. Court W. E., Habib M. S., J. Chromatogr., 73, 274 (1972).
77. Amos R., J. Chromatogr., 48, 343 (1970).
78. Rice D. D., Anal. Chem., 39, 1906 (1967).
79. Klein de W. J., Anal. Chem., 41, 667 (1969).
80. Garner H. R., Packer H., Appl. Spectrosc., 22, 122 (1967).
81. Goodman G. W., "The Application of Spectroscopy to Thin-Layer Chromatography", in Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography, E. J. Shellard, Ed., Academic Press, New York, 1968, p. 91.
82. Kirchner J. G., Miller J. M., Rice R. G., J. Agric. Food Chem., 2, 1031 (1954).
83. Percival C. I., Griffiths P. R., Anal. Chem., 47, 154 (1975).
84. Saier E. I., Acevedo H. F., Dick B. M., Anal. Biochem., 37, 345 (1970).
85. Beyermann K., Roeder E., Z. Anal. Chem., 230, 347 (1967).
86. Beyermann K., Dietz J., Z. Anal. Chem., 256, 349 (1971).

87. *Hermann T. S., Levy R. L., Leng L. J., Post A. A.*, Dev. Appl. Spectrosc., 1968 (7B), 128 (1970).
 88. *Adams D. M., Gardner J. A.*, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2, 2278 (1972).
 89. *Lawson D. D., Getz H. R.*, Chem. Ind. (London), 1961, 1404.
 90. *Wolfrom M. L., Groebke W.*, J. Org. Chem., 28, 2986 (1963).
 91. *Ахрем А. А., Кузнецова А. И.*, Докл. АН СССР, хим. секция, 138, 507 (1961).
 92. *Peijer J. J., Janssen F., Muesing R., Lundberg W. O.*, J. Am. Oil Chem. Soc., 39, 292 (1962).
 93. *Rigby F. L., Bethune J. L.*, Am. Soc. Brewing Chem. Proc., 1955, 174.
 94. *Ott D. E., Gunther F. A.*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 49, 669 (1966).
 95. *Stahl E.*, Analyst (London), 94, 723 (1969).
 96. *Rogers R. N.*, Anal. Chem., 39, 730 (1967).
 97. *Wasicky R., Akisue G.*, Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo, 4, 85 (1966).

Применение тонкослойной хроматографии

Глава XIII

КИСЛОТЫ

1. АЛИФАТИЧЕСКИЕ МОНОКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нормальные кислоты с четным числом атомов углерода — от декановой до докозановой — можно разделить на кизельгуре G, элюируя пробу циклогексаном [1]. Разделения кислот по гексакозановую включительно можно добиться при длине пути элюирования 10 см; этого, однако, недостаточно для разделения высших гомологов. Последние разделяют на слоях кизельгура, высушенных в течение 30 мин при 110°C, методом непрерывного элюирования, описанным Трутером [2]. Элюирование проводят в камере, в крышке которой вырезана щель. Соединения с меньшим числом атомов углерода анализируют на кизельгуре, который сушат при комнатной температуре 3 ч.

Прей и др. [3] анализировали смесь муравьиной, уксусной и молочной кислот на силикагеле G, применяя смесь пиридин—петролейный эфир (1:2); полученные значения R_f равны 0,52, 0,58 и 0,63 соответственно. Анализ с применением смеси этанол—аммиак—вода (80:4:16) дает R_f , равные 0,64, 0,66 и 0,51. Лучший элюент — эфир пироксерной кислоты и дигидроиндантирина.

Лайнс [4] разделял низкомолекулярные карбоновые кислоты на нейтральных слоях силикагеля смесью метилацетат — 2,5 % -ный гидроксид аммония (95:5). При использовании свежего растворителя удовлетворительное разделение достигается в результате двукратного элюирования. Применение растворителя, приготовленного за 24 ч до начала опыта, приводит к другим значениям R_f , поэтому опыты со стандартными и неизвестными компонентами надо проводить одновременно (табл. 13.1). Обнаружение кислот проводят следующим образом: опрыскивают пластинки спиртовым раствором метилового красного, после чего нагревают в печи при 105°C, чтобы удалить аммиак. При

Таблица 13.1

Величины $R_f \cdot 100$ низкомолекулярных карбоновых кислот с неразветвленной и разветвленной цепями, полученные на силикагеле [4]^{а, б}

Кислота	Дублированный опыт		Единичный опыт, растворитель выдерживался 24 ч
	Свежий растворитель	Растворитель выдерживался 24 ч	
Муравьиная	5	7	3
Уксусная	10	13	06
Пропионовая	15	30	15
<i>n</i> -Масляная	24	40	22
<i>n</i> -Валериановая	39	50	30
<i>n</i> -Гексановая	52	57	34
<i>n</i> -Гептановая	55	60	39
<i>n</i> -Октановая	58	66	43
<i>n</i> -Нонановая	61	69	45
Триметилуксусная	57	71	47
α -Метилмасляная (DL)	39	65	39
β -Метилмасляная	34	53	31
Изомасляная	27	57	32

^а С разрешения автора и Elsevier Publishing Co.

^б Растворитель: смесь метилацетат—2,5 %-ный аммиак (95 : 5).

этом кислоты обнаруживаются в виде темно-красных пятен на оранжевом фоне. Браун и Форендор [5] применяли смесь метилэтилкетон—этанол—25 %-ный раствор аммиака (65 : 15 : 28). Лаптон [6] проводил разделение кислот методом распределительной хроматографии на силикагеле, пропитанном 10 %-ным раствором этиленгликоля, применяя для двухступенчатого разделения смесь петролейный эфир (40—60°C)—ацетон (2 : 1), насыщенный этиленгликолем. В этом случае часть пробы всегда остается в точке старта. Байзер [7] разделил первые пять алифатических кислот на силикагеле, проводя в одном направлении элюирование смесью пропанола с аммиаком, а в другом направлении электрофорез. Таким способом удается разделить муравьиную и уксусную кислоты; методом одномерной ТСХ этого достичь нельзя.

Гетлбауэр [8] осуществил хроматографическое разделение на целлюлозе 19 кислот с прямыми и разветвленными цепями

смесью *n*-бутанол—диэтиламин—вода (85 : 1 : 14). Для обнаружения кислот в пределах 0,5 мкг в виде их солей с диэтиламинном использовали нингидрин. Дитман [9] разделял кислоты на слоях целлюлозы, элюируя их смесью *втор*-бутанол—2 н. раствор аммиака (80 : 20). Бахур [10] сумел обнаружить на целлюлозе кислоты с R_f ниже 7 при содержании 0,0025 мкмоль, выдерживая высушенные слои целлюлозы 15 мин в парах пиридина, а затем облучая их также 15 мин коротковолновым УФ-светом. В результате такой обработки на белом фоне хроматограммы появляются коричневые пятна. Используя этот анализ, следует тщательно удалить даже следы летучих кислот, содержащиеся в элюирующем растворителе.

На силанизованном силикагеле был применен метод хроматографии с обращенной фазой со смесями метанол—вода (от 10 : 90 до 60 : 40) [11], диоксан—вода—муравьиная кислота (60 : 35 : 5) [12] и смесь метилцианид—уксусная кислота—вода (7 : 1 : 2,5) [13]. Для разделения сложных метиловых эфиров применяли последнюю смесь, несколько изменив соотношение компонентов (6 : 3 : 1) [13]. Смесь метиловых эфиров можно также элюировать смесью ацетон—метанол—вода—уксусная кислота (60 : 35 : 5) [12]. Некоторые пары этим методом не удавалось разделить; в таких случаях хроматографирование проводят на силанизованных пластинках и насыщают растворители нитратом серебра [14].

Смеси кислот от муравьиной до валериановой делили на слоях кукурузного крахмала смесью бутанол—1,5 н. раствор аммиака (30 : 20) [15].

Метиловые эфиры жирных кислот с разветвленными цепями отделяли от метиловых эфиров ненасыщенных кислот с неразветвленными цепями на слоях, представлявших собой смесь мочевины с целитом (3 : 1) [16]. После нанесения пробы слои выдерживали 12 ч в парах метанола, что способствовало образованию клатратных структур. Элюирование проводили петролейным эфиром. Возможна и другая методика хроматографирования. Пробу, нанесенную на пластинки со слоем силикагеля, обрабатывают 15 мин 7 %-ным раствором мочевины в метаноле, далее сушат 15 мин на воздухе и в заключение элюируют смесью гексан—диэтиловый эфир (1 : 1) [17]. Для таких анализов пригодны также слои мочевины с сульфатом кальция в качестве связующего [18]. Этим методом разделяли *цис*-*транс*-изомеры жирных кислот.

Разделение насыщенных и ненасыщенных кислот проводили на слоях силикагеля, содержащего нитрат серебра, применяя смесь бензол—петролейный эфир (80 : 30) [19]. Метиловые эфиры этих соединений элюируют смесями бензол—петролей-

ный эфир—диэтиловый эфир (80:20:5) [19] или *n*-гексан—бензол (1:1) [20].

Громатка и Ауэ [21, 22] обнаружили линейную зависимость между $\lg R_f$ и числом углеродных атомов для монокарбоновых кислот с четным числом углеродных атомов. Кислоты с нечетным числом углеродных атомов в молекуле также дают аналогичную линейную зависимость, отклонение от которой отмечено для муравьиной и пропионовой кислот. Аналогичные зависимости справедливы и для дикарбоновых кислот, однако отклонения от линейности при этом более значительны.

Ямамото и Фурукава [23] хроматографировали анилиды и фенолгидразиды низших жирных кислот на полосках кремневой кислоты с алебастром в качестве связующего. Разделение проводилось смесями *n*-гексан—этилацетат (1:1), *n*-гексан—бутилацетат (1:1), бензол—бутилацетат (1:1) и этилацетатом. Детектирование производных осуществляли, опрыскивая пластинки смесью серной и азотной кислот (1:1). Фенолгидразиды детектировали на холоду; для обнаружения анилидов хроматографические полосы нагревали. Томсон и Хедин [24] анализировали 2,4-динитрофенолгидразиды, используя смесь хлороформ—метанол—диэтиламин. Для пластинок с оксидом алюминия соотношение компонентов смеси составляло 99:1:0,5, а для пластинок с силикагелем—98:2:0,5. Пробы, нанесенные на слои полиамида, элюировали смесью метанол—вода (9:1). Кислоты от C_2 до C_7 разделяли на слоях силикагеля, используя *n*-броманилиды и *n*-толуидины; смеси кислот состава C_2 — C_{11} анализировали методом обращения фаз на силикагеле, пропитанном парафиновым маслом [25]. Пределы обнаружения при УФ-облучении составляли 0,5 и 2 мкг для броманилидов и толуидинов соответственно.

Некоторые полиеновые жирные кислоты предварительно переводили в ртутные производные, а затем хроматографировали на смешанных слоях кремневая кислота—силикагель (3:7) смесью изобутанол—муравьиная кислота—вода (100:0,5:15,7) [26]. При этом были получены следующие величины R_f кислот: C_{22} -гексаеновая 0,06; C_{20} -пентаеновая 0,15; C_{16} -тетраеновая и C_{22} -пентаеновая 0,23; C_{18} -тетраеновая 0,30; C_{20} -тетраеновая 0,38; C_{16} -триеновая и C_{22} -тетраеновая 0,46; C_{18} -триеновая 0,54; C_{20} -триеновая 0,61; C_{16} -диеновая 0,66; C_{18} -диеновая 0,73; C_{16} -моноеновая 0,74; высшие моноеновые кислоты 0,77—0,82; насыщенные кислоты 0,91—0,96. Выделенные соединения вновь переводили в метиловые эфиры и идентифицировали, используя ряд методов, включая хроматографию на пропитанных парафином слоях оксида кремния с применением смеси уксусная кислота—ацетонитрил—ацетон (2:2:1). Ртутные аддукты метиловых эфиров разделяли на силикагеле,

после чего проводили реакцию окислительного расщепления перманганатом калия в безводной уксусной кислоте, в результате которой образовались моно- и дикарбоновые кислоты [27]. Идентификацию проводили газохроматографически.

Кнаппе и др. [28] переводили анализируемые карбоновые кислоты перед хроматографированием в соответствующие гидроксамовые кислоты. С этой целью 100 мг кислоты смешивали с 3 мл гидроксиламинового реактива (при необходимости добавляли 3 мл тетрагидрофурана) и нагревали 15—30 мин с обратным холодильником. Продукт отфильтровывали от нерастворимого остатка и разбавляли перед нанесением на пластинки. Готовили два стандартных раствора: 1) 69,0 г гидрохлорида гидроксилamina растворяли в 1000 мл метанола и 2) 56,0 г гидроксида калия растворяли в 1000 мл метанола. Непосредственно перед употреблением одну часть первого раствора сливали с двумя частями второго раствора. Разделение проводили на пропитанных пластинках кизельгура, приготовленных смешением 30 г кизельгура G с 12 г полиэфира диэтиленгликольадипината (или полиэфира триэтиленгликольадипината), 60 мл ацетона и 0,05 г диэтилдитиокарбамата натрия (последний препятствует образованию пероксидов). Покрытые адсорбентом пластинки сушат 10 мин на воздухе и 30 мин при 105°C. Элюирование проводили смесью диизопропиловый эфир—петролейный эфир—четырёххлористый углерод—муравьиная кислота—вода (50:20:20:8:1). При опрыскивании раствором, содержащим 16,7 г хлорида железа(III) и 10 мл концентрированной соляной кислоты в 1 л метанола, соединения обнаруживаются в виде фиолетовых пятен на желтом фоне. Значения R_f приведены в табл. 13.2. Хойзер [13] разделял гидроксамовые кислоты на силанизованном силикагеле, используя буферный раствор (pH 3,0) метанол—диоксан—хлороформ—гликоколь (4:3:1:4).

Кнаппе и Родевальд [29] хроматографировали замещенные амиды ацетоуксусной кислоты на слоях адсорбентов, пропитанных полиэфирами.

Авторы работы [30] разделяли *n*-фенилазофенациловые эфиры жирных кислот методом ТСХ с обращением фаз. *N,N*-Диметил-*n*-аминобензофенацил использовали также для анализа кислот [31—33]. На слоях силикагеля можно проводить элюирование смесями бензол—этилацетат (20:1), четыреххлористый углерод—ацетонитрил (9:1) или гексан—ацетон (3:1). Для слоев, пропитанных диметилформамидом [33], пригодна смесь бензола и толуола (5:1). Предел обнаружения этих окрашенных производных составляет примерно 0,05 мкг. Хурачек и Пехова [33] приводят значения R_f 2,4-динитробензиловых эфиров первых девяти алифатических кислот в восьми системах растворителей. Указанные эфиры обнаруживали раство-

Таблица 13.2

Средние величины R_f гидроксамовых кислот, полученных из жирных кислот $C_2—C_{12}$ на кизельгуре, пропитанном полиэфиром (1:3) [28] а, б

Жирная кислота	С диэтиленгликольадипинатом		С триэтиленгликольадипинатом	
	среднее значение R_f	средняя разность	среднее значение R_f	средняя разность
Уксусная	0,15		0,09	
Пропионовая	0,25	0,10	0,13	0,04
Масляная	0,34	0,09	0,19	0,06
<i>n</i> -Валериановая	0,43	0,09	0,26	0,07
Капроновая	0,52	0,09	0,33	0,07
Гептоновая	0,63	0,11	0,43	0,10
Каприловая	0,73	0,10	0,53	0,10
Нониловая	0,84	0,11	0,63	0,10
Каприновая	0,92	0,08	0,76	0,13
Ундециловая	0,94	0,02	0,87	0,11
Лауриновая	0,96	0,02	0,96	0,09

^а С разрешения авторов и Springer-Verlag.

^б Смесь растворителей: диэтиленгликольэфир—петролейный эфир—четырёххлористый углерод—муравьиная кислота—вода (50:20:20:8:1).

ром этилата натрия в ацетоне. Для разделения первых 12 кислот использовали *n*-нитробензоиловые и *n*-бромфенациловые эфиры [34]. Косуге и др. [34а] разделяли 4-оксифенациловые эфиры некоторых алифатических кислот смесью уксусная кислота—циклогексан на силикагеле. Андреев и др. [34б] применяли для разделения нормальных кислот $C_1—C_7$ и их ароматических амидов оксид алюминия и смесь бензол—изоамилацетат (4:1). Пятна фотографировали в УФ-свете и определяли содержание кислоты на микрофотометре. Чувствительность определения составляла $3 \cdot 10^{-9}$ моля.

2. КЕТОКИСЛОТЫ

Для разделения кетокислот, представляющих интерес для биологии, Пассера и др. [35] очищали силикагель, промывая его смесью соляной кислоты и воды (1:1) и 0,1 %-ным раствором ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), чтобы удалить мешающие определению ионы. К очищенному силикагелю

добавляли 13 % алебаstra для возмещения потерь, вызванных действием соляной кислоты. Длина пути разделения составляла 13 см; самые лучшие результаты были получены при разделении смесями пропанол—гидроксид аммония (7:3) и этанол—хлороформ—гидроксид аммония—вода (7:4:2:0,2). После опрыскивания пластинок 0,1 %-ным раствором 2,6-дихлориндофенола в 95 %-ном спирте на небесно-голубом фоне появляются розовые пятна, интенсивность окраски которых можно повысить, выдерживая опрысканную пластинку в парах аммиака. Ринг и Герман [36] первыми проанализировали кетокислоты в виде производных роданина. Полученные производные они разделяли на ацетилцеллюлозе смесями *n*-пропанол—*n*-бутанол—карбонат аммония различной концентрации.

В работах [37—43] описано разделение кетокислот в виде производных 2,4-динитрофенилгидразона; полученные значения R_f приведены в табл. 13.3. Ронкайнен [40] указал, что некоторые производные образуют по два пятна, поскольку в ряде кислых растворителей могут сосуществовать два изомера. Хакинен и Кулонен [44] обратили внимание на некоторую особенность хроматографического разделения 2,4-динитрофенилгидразонов кетокислот, связанную, по-видимому, с наличием 2,4-динитрофенилгидразина, который можно ошибочно принять за производную кетокислоты. Берле [42] применял двумерное разделение на силикагеле в темноте при 3°C; сначала пластинку элюировали смесью бутанол—этанол—0,5 н. аммиак (7:1:2), затем в другом направлении смесью бензол—тетрагидрофуран—уксусная кислота (57:35:8). После разделения кетокислоты можно элюировать с адсорбента и определить содержание кислот в элюате на спектрофотометре при длине волны примерно 370 нм [40, 41]. Разделение на слоях целлюлозы [39] осуществляли, используя смесь бутанол—пропанол—бензол—6 %-ный раствор аммиака (3:10:3:4; 3:11:3:3 или 3:3:4:3).

3. ОКСИКИСЛОТЫ

Дитман [9] разделил ряд оксикислот на слоях целлюлозы, элюируя кислоты смесями растворителей: амиловый спирт—муравьиная кислота—вода (4:40:2), *n*-бутанол—муравьиная кислота—вода (60:10:20) и *втор*-бутанол—2 н. раствор аммиака (80:20). Гетлбауэр [8] провел хроматографический анализ 10 оксикислот в виде солей с диэтиламином на целлюлозе, применяя смесь *n*-бутанол—диэтиламин—вода (85:1:14). Роль обнаруживающего реагента выполнял нингидрин; такой способ позволяет определять 0,5 мкг кислоты. В работе [32] описана методика разделения 4-(4-диметиламинофенилазо)фенациловых эфиров шести оксикислот [32].

Таблица 13.3

Величины R_{st} 2,4-динитрофенилгидразонов кетокислот
в различных системах^а

Кетокислота	Силикагель G		Кислый силикагель G, приготовленный из 30 г силикагеля G + 5 мл пропионовой кислоты + 60 мл воды ^б
	слой 0,3 мм, высушенный при 110°C в течение ~12 ч ^б	слой 0,1 мм, высушенный при 100–120°C в течение 30 мин ^б	
	изоамиловый спирт—0,25 н. гидроксид аммония (20 : 1) [41]	петролейный эфир (60–80°C) — этилформиат (13 : 7) + 0,104 М пропионовая кислота на 100 мл [40]	
Щавелевоуксусная	0,0		
α -Кетоглутаровая	0,0	0,05	0,02
α -Кето- β -метилвалериановая		0,58	0,48
α -Кетокапроновая		0,56	0,48
Ацетоуксусная	0,12		
Пировиноградная (изомер 1)	0,15	0,28	0,20
Пировиноградная (изомер 2)	0,38		
α -Кетоизовалериановая		0,59	0,39
α -Кетомасляная		0,48	0,29
Левулиновая		0,56	0,49
Фенилпировиноградная (изомер 1)	0,30		
Фенилпировиноградная (изомер 2)	0,63		
2,4-Динитрофенилгидразин	1,00	1,00	1,00

^а $R_{st} = R_f(\text{соединения})/R_f(2,4\text{-динитрофенилгидразина})$.

^б Длина пути разделения 11,5 см (насыщенная атмосфера).

Большое число статей [18, 32, 45–53] посвящено разделению таких оксикислот, как лимонная, яблочная, глицериновая, гликолевая, молочная и винная, которые содержатся во фруктах и во многих пищевых продуктах. Мюнье и др. [45] приводят значения R_f , полученные с 15 растворителями на целлюлозе. Баральди [46] описывает двумерное хроматографирование на целлюлозе и указывает четыре пригодных для этого растворителя. Бухбауэр [47] применил двумерное разделение на сили-

кагеле G смесями изобутанол—муравьиная кислота—вода (8:1:1) в одном направлении и этанол—аммиак—вода (25:4:3)—в другом направлении. Троп и Левинджер [48] проводили разделение на слоях из смеси силикагеля и кизельгура (1:1) с тремя смесями: бензол—95 %-ный этанол—аммиак (10:20:5), бутилацетат—метанол—аммиак (15:20:5) и бутилацетат—уксусная кислота—вода (30:20:10). Кислоты обнаруживают в виде коричневых пятен на белом фоне при опрыскивании сначала 10 %-ным раствором нитрата церия-аммония в абсолютном этаноле и затем 0,25 %-ным раствором индола в этом же растворителе. Содержание кислот определяют, измеряя количество диоксида углерода, выделившегося при обработке азотной кислотой и нитратом церия-аммония. Штоль [49], используя тот же адсорбент и смесь бензол—этанол—25 %-ный раствор аммиака (2:4:1), определил кислоты методом газовой хроматографии, переводя их после разделения в метиловые эфиры. Бурже и др. [50] разделяли эти кислоты на целлюлозе смесью бутанол—муравьиная кислота—вода (4:2:5) и определяли их содержание методом денситометрии.

4. ДИКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Дикарбоновые кислоты разделяли хроматографически на кремневой кислоте [54, 55], смеси силикагеля G и кизельгура G [56] и на кизельгуре G, пропитанном полиэтиленгликолем M 1000 [57, 58]. В последнем случае разделение проводилось методом распределительной хроматографии. Банчер и Шерц [59] исследовали ряд адсорбентов и обнаружили, что лучшие результаты дает хроматографирование на слоях целлюлозы с использованием кислой подвижной фазы. Петрович и Пастушка [55] применяли смеси бензол—метиловый спирт—уксусная кислота (45:8:4) и бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) для разделения на слоях кремневой кислоты. Кнаппе и Петери [57, 58] проводили хроматографирование на слоях кизельгура, пропитанных полиэтиленгликолем. В качестве элюента эти авторы выбрали смесь диизопропиловый эфир—муравьиная кислота—вода (90:7:3), насыщенную полиэтиленгликолем (рис. 13.1). Браун и Джинен [54] разделяли аммониевые соли дикарбоновых кислот на слоях силикагеля щелочной смесью 96 %-ный спирт—вода—25 %-ный раствор аммиака (100:12:16). Для обнаружения пригоден ряд индикаторов, например бромфеноловый синий и бромкрезоловый синий. В табл. 13.4 приведены значения R_f для некоторых из этих анализов.

Пастушка и Петрович [60] показали, что *цис-транс*-изомеры кислот можно разделять на слоях силикагеля, элюируя смесью

бензол—метанол—уксусная кислота (45:8:4) или бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) (табл. 13.5). В этом случае пятна обнаруживают опрыскиванием щелочным раствором перманганата калия. Кнаппе и Петери [61] разделяли ненасыщенные алифатические дикарбоновые кислоты на кизельгуре, пропитанном полиэтиленгликолем М 4000, применяя смесь изопро-

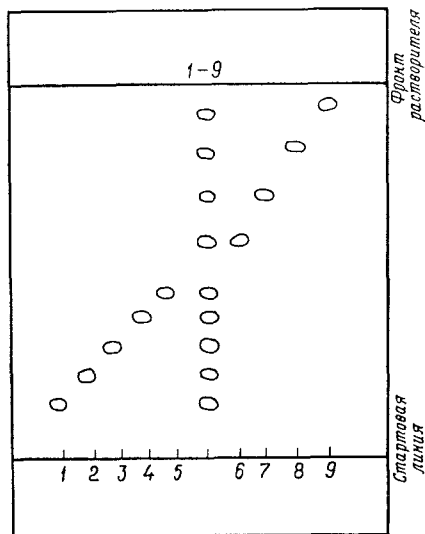


Рис. 13.1. Разделение дикарбоновых кислот на кизельгуре G, пропитанном полиэтиленгликолем М 1000 (1:0,5) [57] (с разрешения авторов и Springer-Verlag).

Растворитель: смесь диизопропиловый эфир—муравьиная кислота—вода (90:7:3); длина пути разделения 12 см. Выделенные кислоты: 1—щавелевая, 2—малоновая, 3—янтарная, 4—глутаровая, 5—адипиновая, 6—пимелиновая, 7—пробковая, 8—азелаиновая, 9—себациновая.

пиловый эфир—муравьиная кислота—вода (90:7:3). Для облегчения идентификации смешанных кислот авторы проводили двумерное хроматографирование с тем, чтобы направить ненасыщенные кислоты в одном направлении, прогидрировать их и провести разделение насыщенных кислот в другом направлении. В результате были получены следующие значения R_f : малеиновая кислота 0,20; цитраконовая кислота 0,32; глутаконовая кислота 0,36; итаконовая кислота 0,38; фумаровая кислота 0,61; мезаконовая кислота 0,75.

Сурьяраман и Кейв [62] применяли смесь этанол—гидроксид аммония—тетрагидрофуран (7:3:3) для разделения моно- или дикарбоновых кислот на пластинках с силикагелем G. Гебель и Клингенберг [63] добились хорошего разделения субстратов цикла трикарбоновой кислоты двумерным хроматографированием. Разделение на слоях целлюлозы проводили в одном направлении смесью 95 %-ный этанол—25 %-ный гидроксид аммония—вода (8:2:1); при этом кислоты перемеща-

Таблица 13.4

Величины $R_f \times 100$ некоторых дикарбоновых кислот

Кислота	Силикагель G, пропитанный полиэтиленгликолем М 1000 (1,0 : 0,5) ^а	Силикагель G ^б			Силикагель G—кизельгур G (1 : 1) ^в		
		А	Б	В	Г	Д	Е
Щавелевая	14	5	0	0	6	10	16
Малоновая	21	14	13	5	13	20	55
Янтарная	28	30	28	23	20	30	74
Глутаровая	36	39	35	28	27	38	77
Адипиновая	43	43	42	34	32	47	80
Пимелиновая	55	53	47	36	—	—	—
Пробковая	67	54	50	40	—	—	—
Азелаиновая	82	56	53	43	—	—	—
Себациновая	92	67	55	47	—	—	—
Яблочная	20	—	13	6	8	20	54
Лимонная	—	5	2	2	4	12	49
Виннокаменная	—	8	—	—	4	14	42

^а Растворитель: диизопропиловый эфир—муравьиная кислота—вода (90:7:3), пропитанный полиэтиленгликолем М 1000. Насыщенная атмосфера. Длина пути разделения 12 см [57].

^б Длина пути разделения 10 см. А) Растворитель: 96 %-ный этанол—вода—25 %-ный гидроксид аммония (100:12:16). Разделение в виде аммониевых солей. Ненасыщенная атмосфера [54]. Б) Растворитель: бензол—метанол—уксусная кислота (45:8:4) [55]. В) Растворитель: бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) [55].

^в Длина пути разделения 6 см [56]. Г) Растворитель: бензол—этанол—гидроксид аммония (10:20:5). Д) Растворитель: бутилацетат—метанол—гидроксид аммония (15:20:5). Е) Растворитель: бутилацетат—уксусная кислота—вода (30:20:10).

лись в виде солей аммония. Пластинку затем поворачивали под прямым углом и элюировали в этом направлении смесью изобутанол—5 М муравьиная кислота (2:3), в которой субстраты перемещаются в виде недиссоциированных кислот. Количественное определение проводят с помощью соответствующей ферментативной реакции или автордиографически.

Нигаард [64] применял методику двумерного разделения, проводя электрофорез на целлюлозе в одном направлении, а затем хроматографирование со смесью изоамиловый спирт—5 М уксусная кислота (2:1) в другом направлении.

Таблица 13.5

Величины $R_f \times 100$ *цис*- и *транс*-изомеров кислот, полученные на слоях силикагеля толщиной 0,3 мм (длина пути разделения 10 см) [60]^a

Кислота	Бензойная кислота — метанол — уксусная кислота (45 : 8 : 4)	Бензол — диоксан — уксусная кислота (90 : 25 : 4)
Изокротоновая	70	71
Кротоновая	73	73
Тиглиновая	71	79
Маленная	13	6
Фумаровая	43	22
Цитраконовая	18	7
Мезаконовая	55	53
Итаконовая	46	34
<i>цис</i> -Аконитовая	3	4
<i>транс</i> -Аконитовая	12	4

^a С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

5. КИСЛОТЫ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА

Франкенфельд [65] осуществил хроматографический анализ кислот ароматического ряда на слоях силикагеля, элюируя их смесью бензол—пиридин (17 : 3).

Разделение и определение салицилсалициловой кислоты в салициловой кислоте осуществляли методом ТСХ на оксиде алюминия G, применяя 0,1 н. раствор соляной кислоты в абсолютном этаноле [66]. Количественный анализ завершали элюированием пятен и спектрофотометрическим промером элюата в УФ-области.

Авторы работы [67] выделили из мочи и идентифицировали 3-метокси-4-оксиминдальную кислоту—важный продукт метаболизма норадреналина и адреналина. Кислоту экстрагировали из мочи этилацетатом, раствор концентрировали, осушали и наносили непосредственно на пластинки с силикагелем G. При элюировании смесью изопропанол—этилацетат—гидроксид аммония—вода (45 : 30 : 17 : 8) разделение заканчивается через 90 мин. Полуколичественное определение можно провести, срав-

нивая пятна со стандартом после опрыскивания 0,1% -ным раствором 2,6-дихлорхинон-4-хлоримида в этаноле. Количественное определение проводят, элюируя пятно и измеряя поглощение элюата в области 510 мкм после диазотирования *n*-нитроанилином.

Гомованилиновая кислота—обычный компонент мочи. Зная содержание этого компонента, легче поставить диагноз заболевания. Санкофф и Суркс [68] разработали методику определения гомованилиновой кислоты (4-окси-3-метоксифенилуксусной кислоты) в моче. Пробу (5 мл мочи) подкисляют соляной кислотой до pH от 1 до 2, далее, насытив раствором хлорида натрия, экстрагируют сначала 6 мл, а затем 5 мл этилацетата. Объединенные экстракты упаривают при пониженном давлении и остаток переводят в 0,5 мл метанола. Этот раствор наносят в виде пятен непосредственно на пластинки силикагеля G и элюируют верхним слоем смеси бензол—уксусная кислота—вода (2 : 3 : 1). Гомованилиновую кислоту обнаруживают, опрыскивая пластинки 1 н. раствором фенольного реактива Фолина, а затем 10% -ным раствором карбоната натрия. Количественное определение проводят, элюируя пятно, предварительно обработанное фенольным реактивом Фолина, и измеряя затем поглощение в области 750 нм. Таутц и др. [69] описали методику количественного определения этой кислоты и родственных соединений.

Могра и др. [70] разделили стереоизомеры 2-метил-3-(6-метокси-2-нафтил)пентановой и 2-метил-2-пропил-3-(6-метокси-2-нафтил)пентановой кислот, а также соответствующие нитрилы и метиловые эфиры на оксиде алюминия и силикагеле.

Миллет и др. [71] определяли фуранкарбовую кислоту в присутствии оксиметафуранкарбовой кислоты.

Колесинская и др. [72, 73] провели хроматографический анализ группы карбоновых кислот ряда бензола, а Кнаппе и Штук [74] использовали распределительный метод для разделения замещенных бензойных кислот. Табак и др. [75] провели разделение группы замещенных бензойных кислот на пластинках силикагеля, содержащих оксид серебра.

Борис [76] разделял некоторые фенилалкановые кислоты, элюируя их анилиды на оксиде алюминия смесью гексан—этил-ацетат (10 : 3).

6. ФЕНОЛОКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Эти кислоты разделяют на силикагеле, в который иногда вводят некоторые комплексообразующие реагенты. Фурукава [77] использовал хроматографические полосы силикагеля с албастром в качестве связующего для разделения групп этих сое-

Таблица 13.6

Величины $R_f \times 100$ некоторых фенолокарбоновых кислот
(см. также табл. 3.6)

Кислота	Из работы [81] ^а			Из работы [83] ^б		Из работы [87] ^в	
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж
Салициловая	72	88	48			84	37
Протокатеховая	32	55	10	32	39	35	42
Гентизиновая	35	65	17	30	40	32	35
2,4,6-Триоксибензойная	15	50	10				
<i>n</i> -Оксифенилуксусная	35	72	14				
<i>m</i> -Оксифенилуксусная	32	65	19				
2,5-Диоксифенилуксусная	67	85	43				
α -Резорциловая	21	61	73				
β -Резорциловая	57	85	19	54	52		
γ -Резорциловая	10	15	10				
Ванилиновая	46	76	29	54	61	75	48
Феруловая	42	76	16	50	58	79	30
Изоферуловая						75	26 г 44 д
Сиреневая	33	57	16	48	60	82	59
<i>m</i> -Оксибензойная				49	51		
<i>n</i> -Оксибензойная						60	46
Галловая				18	23	11	37
<i>o</i> -Кумаровая						60	21
<i>n</i> -Кумаровая				49	52	64	26 г 40 д
Кофейная						35	25 г 41 д
Дигидрокофейная						46	51

^а Хроматографические полосы кремневой кислоты с крахмалом в качестве связующего, толщина слоя 0,5 мм; длина пути разделения 10–11 см. Растворитель: А — эфир—скеллизоль В (7:); В — этилацетат—скеллизоль В (3:1); В — ацетон—скеллизоль В (1:3).

^б Силикагель G, толщина слоя 0,5 мм; длина пути разделения 10 см. Растворитель: Г — бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4); Д — бензол—метанол—уксусная кислота (90:16:8).

^в Полиамид с крахмалом в качестве связующего, толщина слоя 0,15 мм; длина пути разделения 15 см. Растворитель: Е — этилацетат—уксусная кислота (95:5); Ж — уксусная кислота—вода (30:70).

^г Главное пятно.

^д Вторичное пятно.

динений. Элюентами служили гексан—этилацетат (4:1 или 3:2), бензол—диэтиловый эфир (4:1) или бензол. Халмекоски [78] исследовал влияние хелатообразующих солей на разделение фенолокарбоновых кислот различными смесями растворителей (см. табл. 3.4). Лучшее разделение гомологов катехина было достигнуто со смесью этилацетат—изопропанол—вода (65:24:11), лучшее разделение гомологов гваякола — со смесью *n*-бутиловый эфир (насыщенный водой) — уксусная кислота (10:1).

В работе [79] описано разделение на слоях силикагеля группы фенолокислот, содержащихся в растениях. Кислоты, в молекулы которых входят только группы OH, элюировали смесью дихлорметан—уксусная кислота—вода (2:1:1), а для кислот, содержащих группы OH и CH₃O, а также для салициловой кислоты использовали смесь бензол—уксусная кислота (45:4). Количественные результаты получали, спектрофотометрируя растворы, полученные при элюировании разделенных соединений. Янгаард [80] исследовал большое число таких соединений и обнаруживаемых в растениях других производных фенола на слоях целлюлозы, применяя в качестве растворителей 2 %-ную муравьиную кислоту, 20 %-ный раствор хлорида калия, смесь изопропанол—аммиак—вода (8:1:1) и уксусную кислоту.

В работе [81] описана методика разделения на хроматографических полосах со слоями кремневой кислоты большой группы фенолокарбоновых кислот и их производных. Используя флуоресцирующие слои, как это рекомендуют делать Кирхнер и др. [82], авторы [81] обнаруживали соединения либо по их собственной флуоресценции, либо по поглощению в УФ-свете; в последнем случае на флуоресцирующем фоне наблюдается темное пятно. Пастушка [83] разделил на слоях силикагеля G группу из 22 фенолов и фенолокарбоновых кислот. Он исследовал пять диазотирующих реактивов, позволяющих получить окрасенные производные анализируемых соединений, привел соответствующие величины R_f и описал цвета получаемых пятен. Кратцл и Пушмен [84] провели хроматографический анализ на слоях силикагеля G фенолокарбоновых кислот и других соединений продуктов распада лигнина. Применялся метод препаративного разделения. В табл. 13.6 приведены величины R_f ряда фенолокарбоновых кислот.

Ванг и Лин [85] описали разделение природных фенолокислот и родственных соединений на слоях полиамидов. Слои готовили следующим образом. Растворяли 20 г полиамидной смолы в 100 мл 80 %-ной муравьиной кислоты. Растворитель удаляли в камере, покрытой фильтровальной бумагой, при температуре 25°C в присутствии водяного пара. После 12-часовой

выдержки пластинки сушили 15 мин при 130°C. Элюирование проводили бензолом, хлороформом, этилацетатом и ацетоном. В работе приведены величины R_f , однако соединения не идентифицированы.

Ванг [86] получил величины R_f для некоторых фенолокислот на полиамидах, используя смесь этилацетат—уксусная кислота (95:5). Так, для *o*-, *m*- и *p*-оксисбензойных кислот R_f равна соответственно 0,57, 0,38 и 0,42, а для дубильной и галловой кислот — 0,06 и 0,10 соответственно.

Урион и др. [87] провели разделение фенолокислот ячменя на тонких слоях полиамидов. В этом случае слои готовили из гранулированного материала, применяя, согласно методике Кирхнера и др. [82], в качестве связующего крахмал. Элюентом служил растворитель Ванга и Лина [85], а также смесь уксусная кислота—вода (30:7) (см. табл. 13.6).

Рамо [88, 89] исследовал разделение депсидов и депсидонов орсинового масла и полученные результаты использовал при разделении кислот лишайников. Для разделения он применял смесь бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4) и силикагель HF. В то же время Бахман [90] изучал кислоты лишайников группы β -орсина в экстрактах *Parmelia robusta* на силикагеле с теми же смесями растворителей. Кульберсон и Кристинсон [91] и Кульберсон [92] разработали систематический метод идентификации более 200 природных «лишайниковых соединений» и их производных. Разделение ведется на пластинках с силикагелем F₂₅₄ фирмы Меск тремя системами растворителей: бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4), гексан—этиловый эфир—муравьиная кислота (5:4:1) и толуол—уксусная кислота (85:15). Для облегчения идентификации предусмотрена система перфокарт. Однако со времени опубликования этой работы рецептура пластинок была значительно изменена и относительные значения R_f существенно изменились. В работе [93] приведены некоторые поправки, компенсирующие такие различия, и прежде чем пользоваться данным методом, с этой работой необходимо ознакомиться.

Фенолокарбоновые кислоты разделяли также методом электрофореза [94] на слоях силикагеля G или кизельгура G. Пластины силикагеля готовили, смешивая 4,5 г силикагеля с 8 мл 3%-ного раствора борной кислоты. Для приготовления электролита применяли смесь из 80 мл этанола, 30 мл воды, 4 г борной кислоты и 2 г кристаллического ацетата натрия, доводя уксусной кислотой pH до 4,5. Для приготовления слоев кизельгура G 6,5 г густой суспензии диатомовой земли смешивали с 9 мл 3%-ного раствора борной кислоты. Электролит в этом случае оставался тем же, только pH его доводили уксусной кислотой до 5,5. Оба вида разделения проводили при напряженности

Таблица 13.7

Электрофорез фенолокарбоновых кислот на слоях силикагеля и кизельгура [94] а, б

Кизельгур		Силикагель		M, г	Кислота	M, г	Направление		Окраска
Окраска	в	Направление	в						
(1) д		Анод	Анод	0,99	Салициловая	0,49	Анод	(2) д	
Желто-коричневая		Анод	Анод	1,12	Протокатехиновая	0,83	Анод	Ярко-коричневая	
Желто-коричневая		Анод	Анод	0,92	Генгизиновая	0,56	Анод	Ярко-красная	
Желтая		Анод	Анод	1,00	<i>m</i> -Оксисбензойная	1,00	Анод	Желтая	
Желтая		Анод	Анод	0,86	<i>p</i> -Оксисбензойная	0,77	Анод	Желтая	
Красно-желтая		Анод	Анод	0,90	β -Резорциловая	0,64	Анод	Красно-коричневая	
Оранжевая		Анод	Анод	1,05	Галловая	0,64	Анод	Оранжевая	
Желтая		Анод	Анод	0,86	<i>n</i> -Кумаровая	0,72	Анод	Желто-коричневая	
Желто-коричневая		Анод	Анод	1,07	Кофейная	0,66	Анод	Коричневая	
Коричневая		Анод	Анод	0,87	Ванилиновая	0,86	Анод	Желто-коричневая	
Желто-красная		Анод	Анод	0,83	Сиреневая	0,74	Анод	Желто-красная	
Коричневая		Анод	Анод	0,77	Феруловая	0,73	Анод	Желто-коричневая	
Красная		Анод	Анод	0,78	Изоферуловая	0,76	Анод	Красная	

а С разрешения авторов и Alfred Huetig Verlag.

б См. текст, касающийся приготовления слоев.

в Окраска появляется под действием диэтилового бензина.

г Длина пути разделения относительно пути, пройденного оксисбензойной кислотой.

д Обнаружение проводится: 1) щелочным раствором перманганата, 2) пентахлоридом сурьмы.

поля 20 В/см. Значения M_g , относящиеся к *m*-оксибензойной кислоте, даны для шести фенолов и фенолокарбоновых кислот. В табл. 13.7 приведены результаты разделения фенолокарбоновых кислот.

Хелук и др. [95] разделял фенолокарбоновые кислоты методом ТСХ в одном направлении и методом электрофореза — в другом. Пробу наносили на слой силикагеля. Бензойные кислоты элюировали смесью бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4); а коричные кислоты анализировали методом тонкослойного электрофореза, причем рН смеси растворителей бензол—метанол—уксусная кислота (45:8:4) доводили до 5,3 буферным раствором пиридин—уксусная кислота—вода (25:10:24) [96]. На тонких слоях полиамидов хроматографирование осуществляли смесью этилацетат—уксусная кислота (95:5), затем проводили электрофорез бензойных кислот рН 8,9 (буфер Аронсона) и коричных кислот при рН 3,55; в последнем случае растворителем служила смесь пиридин—уксусная кислота—вода (1:6:90). На целлюлозе сначала проводили тонкослойный электрофорез при рН 5,3, а затем тонкослойное хроматографирование 30 %-ной уксусной кислотой.

Фенолокислоты анализировали [96] методом двумерной хроматографии на целлюлозе, применяя смеси изопропанол—25 %-ный аммиак—вода (8:1:1) и бензол—уксусная кислота—вода (2:3:1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Purdy S. J., Truter E. V., J. Chromatogr., 14, 62 (1964).
2. Truter E. V., J. Chromatogr., 14, 57 (1964).
3. Prey V., Berbalk H., Kausz M., Microchim. Acta., 1962, 449.
4. Lynes A., J. Chromatogr., 15, 108 (1964).
5. Braun D., Vorendohre G., Chromatographia, 1, 405 (1968).
6. Lupton C. J., J. Chromatogr., 104, 223 (1975).
7. Bayzer H., J. Chromatogr., 27, 104 (1967).
8. Guetlbauer F., J. Chromatogr., 45, 104 (1969).
9. Dittmann J., J. Chromatogr., 34, 407 (1968).
10. Bachur N. R., Anal. Biochem., 13, 463 (1968).
11. Rodrigues J. F. De Miranda, Eikelboom T. D., J. Chromatogr., 114, 274 (1975).
12. Ord W. O., Bamford P. C., Chem. Ind. (London), 1966, 1681.
13. Heusser D., J. Chromatogr., 33, 62 (1968).
14. Ord W. O., Bamford P. C., Chem. Ind. (London), 1967, 277.
15. Canić V. D., Perisić-Janjić N., Tech., 25, 330 (1970); through Chem. Abstr., 73, 3137m (1970).
16. Hradec J., Menšík P., J. Chromatogr., 32, 502 (1968).
17. Мианник Е., Иконопищева, Известия Академии наук Эстонской ССР, Химия и геология, 21, 53 (1972).
18. Bhatnagar V. M., Liberii A., J. Chromatogr., 18, 177 (1965).

19. Stocchi A., Holman R. T., Riv. Ital. Sostanze Grasse, 48, 617 (1971); through Anal. Abstr., 23, 1968 (1972).
20. Achman R. G., Hooper S. N., Hingley J., J. Chromatogr. Sci., 10, 430 (1972).
21. Hromatka O., Aue W. A., Monatsh. Chem., 93, 497 (1962).
22. Hromatka O., Aue W. A., Monatsh. Chem., 93, 503 (1962).
23. Yamamoto K., Furukawa T., Hiroshima Univ. J. Fac. Educ., 5, 85 (1957).
24. Thompson A. C., Hedin P. A., J. Chromatogr., 21, 13 (1966).
25. Lebacqz J. P., Severin M., Casimir J., Renard M., Bull. Rech. Agron. Gembloux, 4, 130 (1969).
26. Wagner H., Pohl P., Biochem. Z., 340, 337 (1964).
27. Pohl P., Glasl H., Wagner H., J. Chromatogr., 42, 75 (1969).
28. Knappe E., Yekundi K. G., Z. Anal. Chem., 203, 87 (1964).
29. Knappe E., Rohdewald I., Z. Anal. Chem., 208, 195 (1965).
30. Vioque E., Maza M. P., Grasas Aceites (Seville, Spain), 15, 63 (1964).
31. Esterbauer H., Just W., Sterk H., Fette, Seifen, Anstrichm., 74, 13 (1972).
32. Seligman I. M., Doy F. A., Anal. Biochem., 46, 62 (1972).
33. Churáček J., Pechová H., J. Chromatogr., 48, 250 (1970).
34. Dhont J. H., Kuijpers G. G., de Beauveser J. C., Chem. Tech. (Amsterdam), 26, 473 (1971).
- 34a. Kosuge S., Furuta M., Takikawa Y., Jap. Anal., 18, 235 (1969).
- 34b. Андреев Л. В., Финкельштейн З. И., Беляев С. С., Прикладная биохимия и микробиология, 10, 308 (1974).
35. Passera C., Pedrotti A., Ferrari G., J. Chromatogr., 14, 289 (1964).
36. Rink M., Herrmann S., J. Chromatogr., 14, 523 (1964).
37. Colte J., Collombel C., Cuvivre M., Padis L., Rev. Fr. Etud. Clin. Biol., 12, 496 (1967).
38. Ronkainen P., J. Chromatogr., 28, 263 (1967).
39. Chiari D., Roehr M., Mikrochim. Acta, 1967, 140.
40. Ronkainen P., J. Chromatogr., 11, 228 (1963).
41. Dancis J., Hutzler J., Levitz M., Biochim. Biophys. Acta, 78, 85 (1963).
42. Berlet H. H., Anal. Biochem., 22, 525 (1968).
43. Ariga N., Anal. Biochem., 49, 436 (1972).
44. Haekkinen H. M., Kulonen E., J. Chromatogr., 18, 174 (1965).
45. Munier R. L., Drapier A. M., Favre B., Chromatographia, 6, 466 (1973).
46. Baraldi D., J. Chromatogr., 42, 125 (1969).
47. Buchbauer G., Sci. Pharm., 40, 259 (1972); through Anal. Abstr., 25, 448 (1973).
48. Trop M., Levinger I. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 621 (1970).
49. Stoll U., J. Chromatogr., 52, 145 (1970).
50. Bourzeix M., Guiraud J., Champagnol F., J. Chromatogr., 50, 83 (1970).
51. Равдел Г. А., Жукова Г. Ф., Щукина Л. А., Журнал аналитической химии, 26, 2023 (1971).
52. Lehman G., Martinod P., Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 130, 269 (1966).
53. Schweiger A., Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 124, 20 (1963).
54. Braun D., Geenen H., J. Chromatogr., 7, 56 (1962).
55. Petrowitz H.-J., Pastuska G., J. Chromatogr., 7, 128 (1962).
56. Bancher E., Scherz H., Prey V., Mikrochim. Acta, 1963, 712.
57. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 188, 184 (1962).
58. Knappe E., Peteri D., J. Anal. Chem., 188, 352 (1962).
59. Bancher E., Scherz H., Mikrochim. Acta, 1964, 1159.
60. Pastuska G., Petrowitz H. J., J. Chromatogr., 10, 517 (1963).
61. Knappe E., Peteri D., Z. Anal. Chem., 190, 380 (1962).
62. Suryaraman M. G., Cave W. T., Anal. Chim. Acta, 30, 96 (1964).
63. Goebell H., Klingenberg M., Chromatogr., Symp., 2nd, Brussels, 1962, 153.
64. Nygaard P., J. Chromatogr., 30, 240 (1967).
65. Frankenfeld J. W., J. Chromatogr., 18, 179 (1965).

66. Bailey R. W., Anal. Chem., **36**, 2021 (1964).
 67. Schmid E., Henning N., Klin. Wochenschr., **41**, 566 (1963).
 68. Sankoff I., Sourkes T. L., Can. J. Biochem. Physiol., **41**, 1381 (1963).
 69. Tautz N. A., Voltmer G., Schmid E., Klin. Wochenschr., **43**, 233 (1965).
 70. Maugras M., Robin Ch., Gay R., Bull. Soc. Chim. Biol., **44**, 887 (1962).
 71. Millett M. A., Moore W. E., Saeman J. F., Anal. Chem., **36**, 491 (1964).
 72. Kolesinska J., Urbanski T., Wielopolski A., Chem. Anal. (Warsaw), **10**, 1107 (1965).
 73. Kolesinska J., Urbanski T., Wielopolski A., Chem. Anal. (Warsaw), **11**, 473m (1966).
 74. Knappe E., Stuck J.-I., Z. Anal. Chem., **227**, 353 (1967).
 75. Tabak S., Mauro A. E., Del'Acqua A., J. Chromatogr., **52**, 500 (1970).
 76. Borjes G. F., J. Chromatogr., **36**, 377 (1968).
 77. Furukawa T., Nippon Kagaku Zacchi, **80**, 387 (1959); Chem. Abstr., **54**, 13938 (1960).
 78. Halmekoski J., Suomen Kemistil., **35B**, 39 (1962).
 79. Schmidlein H., Herrmann K., J. Chromatogr., **115**, 123 (1975).
 80. Jangaard N. O., J. Chromatogr., **50**, 146 (1970).
 81. Lyman R. L., Livingston A. L., Bickoff E. M., Booth A. N., J. Org. Chem., **23**, 756 (1958).
 82. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
 83. Pastuska G., Z. Anal. Chem., **179**, 355 (1961).
 84. Kratzl K., Puschmann G., Holzforschung, **14**, 1 (1960).
 85. Wang K.-T., Lin Y.-T., J. Chin. Chem. Soc. (Taiwan), **10**, 146 (1963).
 86. Wang K.-T., J. Chin. Chem. Soc. (Taiwan), **8**, 241 (1961).
 87. Urion E., Metche M., Haluk J. P., Brauwissenschaft, **16**, 211 (1963).
 88. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 97 (1963).
 89. Ramaut J. L., Bull. Soc. Chim. Belg., **72**, 316 (1963).
 90. Bachmann O., Oesterr. Bot. Z., **110**, 103 (1963).
 91. Culberson C. F., Kristinsson H.-D., J. Chromatogr., **46**, 85 (1970).
 92. Culberson C. F., J. Chromatogr., **72**, 113 (1972).
 93. Culberson C. F., J. Chromatogr., **97**, 107 (1974).
 94. Pastuska G., Trinks H., Chem.-Ztg., **85**, 535 (1961).
 95. Haluk J. P., Duval C., Metche M., Int. Symp. Chromatogr. Electrophoresis, 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 431.
 96. Humbel R., Rev. Roum. Biochim., **7**, 45 (1970); through Chem. Abstr., **73**, 53831k (1970).

СПИРТЫ И ГЛИКОЛИ

1. РАЗДЕЛЕНИЕ СПИРТОВ

Спирты с четным числом углеродных атомов в цепи — от деканола до гексакозанола — разделяют хроматографически на кизельгуре G; элюентом служит циклогексан [1]. Стенки камеры для разделения выстилают фильтровальной бумагой, пропитанной циклогексаном, с тем чтобы хроматографирование проходило в насыщенной атмосфере. Аттавей и Вольфорд [2] приводят значения R_f низших спиртов, полученные на силикагеле (табл. 14.1). Кучера [3] разделял эти соединения (табл. 14.1)

Таблица 14.1

Величины $R_f \times 100$ некоторых спиртов ^a

Спирт	Оксид алюминия (незакрепленные слои) [3]			Силикагель G [2]
	гексан-ацетон (3:1)	эфир-этанол (99:1) ^б	гексан-ацетон (4:1)	метилхлорид
<i>n</i> -Бутанол	25	92	25	18
Изобутанол				19
<i>n</i> -Пентанол	30	93	26	20
Изопентанол				21
<i>n</i> -Гексанол	35	95	27	20
3-Гексенол-1				25
Метилгептенол				26
<i>n</i> -Октанол	43	96	30	23
<i>n</i> -Нонанол				24
<i>n</i> -Деканол				26
Бензиловый	20	95	17	
Диацетоновый		86	36	

^a Длина пути разделения на оксиде алюминия 20 см, на силикагеле F 15 см.

^б 100 мл встряхивают с 10 мл воды и используют верхний слой.

на оксиде алюминия, используя несколько различных систем растворителей. Ни метанол, ни этанол разделить хроматографически на оксиде алюминия нельзя из-за высокой их летучести. В качестве обнаруживающих реагентов использовали иод, аммиачный раствор нитрата серебра или концентрированную серную кислоту; в последнем случае пластинку после опрыскивания нагревали. Чтобы при опрыскивании аммиачным раствором фон был белым, адсорбент тщательно очищают. После опрыскивания 5 %-ным раствором нитрата серебра в 10 %-ном водном растворе аммиака пластинки сушат 3—5 мин в темноте при 140°C. Синг и Гершбейн [4] разделили 13 высших спиртов на силикагеле, элюируя пробу бутанолом-1, насыщенным водой; некоторые спирты разделяли с помощью других растворителей. Нобухара [5] приводит значения R_f для 14 насыщенных и ненасыщенных спиртов от C_6 до C_{12} , полученные на силикагеле G при использовании смесей ацетон—вода (6:4) и диоксан—вода (6:4). Методом ТСХ осуществлен анализ винилацетиленовых спиртов и ацетиленовых кетоспиртов и их сложных эфиров [6], моно-, ди- и триеновых спиртов [7]. Морис и др. [8] хроматографически разделили изомеры положения алифатических спиртов с длинной цепью. Данфи и др. [8a] разделили *цис*- и *транс*-изомеры изопреноидных спиртов на кизельгуре методом хроматографии с обращенными фазами.

Кучера [3] предложил хроматографически разделять гликоли при определении спиртов в простых эфирах, поскольку значение R_f сильно зависит от небольших изменений в концентрации этанола в системе растворителей спирт—простой эфир. Ахрем и др. [9] хроматографировали ацетиленовые спирты на незакрепленных слоях оксида, элюентом служила смесь эфир—бензол.

Вассерман и Ханус [10] разделяли некоторые восстановленные сахара на слоях смеси кизельгур—силикагель G (3:2), элюируя их смесью изопропанол—этилацетат—вода (27,0:3,5:2,0). Хотя разделение было достаточно хорошим, полученные значения R_f воспроизводились плохо. Прей и др. [11] при разделении на силикагеле G использовали смесь бутанол—вода (9:1); Грасхоф [12, 13] обнаружил, что силикат магния является хорошим адсорбентом, если элюирование ведется смесями *n*-пропанол—вода (5:5) и *n*-пропанол—вода—*n*-пропиламин (5:3:2). Значения R_f некоторых восстановленных сахаров приведены в табл. 14.2. Хей и др. [14] приводят следующие значения R_f для восстановленных сахаров, полученные на силикагеле при разделении смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—диэтиловый эфир—вода (9:6:3:1): эритрит 0,52; D-маннит 0,38; D-сорбит 0,39, дульцит 0,36, глицерин 0,58 и маллит 0,10. Валди [15] описал методику разделения некоторых восстановленных

Таблица 14.2

Величины $R_f \times 100$ некоторых восстановленных спиртов

Спирт	Силикагель [11] и <i>n</i> -бутанол—вода (9:1)	Силикат магния (Woelm)			
		<i>n</i> -пропанол—вода (1:1) [12]	<i>n</i> -пропанол—вода— <i>n</i> -пропиламин (5:3:2) [12]	<i>n</i> -пропанол—вода—хлороформ (6:2:1) ^a [13]	<i>n</i> -пропанол—этилметилкетон (2:1:1) ^a [13]
L-Арабит	—	70	55	36	52
D-Сорбит	50	65	48	27	43
D-Маннит	50	70	51	30	46
Дульцит	—	67	50	28	43
Гликоль	45	—	—	65	—
Глицерин	38	74	61	53	72

^a Разделение в ненасыщенной атмосфере; длина пути разделения 10 см.

сахаров. Кастаньола [16] определял содержание маннита в продажном сорбите, элюируя пробу изопропанолом и 0,1 н. борной кислотой, взятых в соотношении 17:3.

Валентинис и Ренцо [17] определяли сорбит и маннит в вине методом двумерной ТСХ на силикагеле, пропитанном борной кислотой. Растворителями служили смеси диоксан—метанол—вода (5:3:2) в одном направлении и метанол—вода (6:4)—в другом.

Хара и Такеуши [18] разделяли некоторые спирты, содержащиеся в желчи, на слоях силикагеля, высушенных при 130°C, элюируя смесью хлороформ—метанол (9:1). Длина пути разделения составляла 15 см; наиболее чувствительным методом детектирования оказалось обугливание: нагревание пластинки, опрысканной концентрированной серной кислотой. Таким способом были обнаружены следующие соединения: 3 α ,24-диокси-5 β -холан (R_f 0,82), 3 α ,12 α ,24-триокси-5 β -холан (R_f 0,34) и 3 α ,7 α ,12 α ,24-тетраокси-5 β -холан (R_f 0,10). Казуно и Хошита [19] осуществили хроматографический анализ 40 спиртов, входящих в состав желчи.

Проводя исследования в области липидов, Кауфман и Дас [20] и Кауфман и Визмантан [21] разделили ряд спиртов воска (рис. 14.1 и 14.2) на кизельгуре G, пропитанном 10 %-ным раствором парафина в петролейном эфире (50—70°C). Разде-

ление проводили 85 %-ной уксусной кислотой или 90 %-ным ацетоном. Использовали также кизельгур, пропитанный фракцией нефти с температурой кипения 240—250 °С, и систему растворителей изопропанол—этанол—уксусная кислота—вода (8:3:4:2), насыщенную тем же веществом, которым пропитывали слой. Для обнаружения пятен пластинки опрыскивали фос-

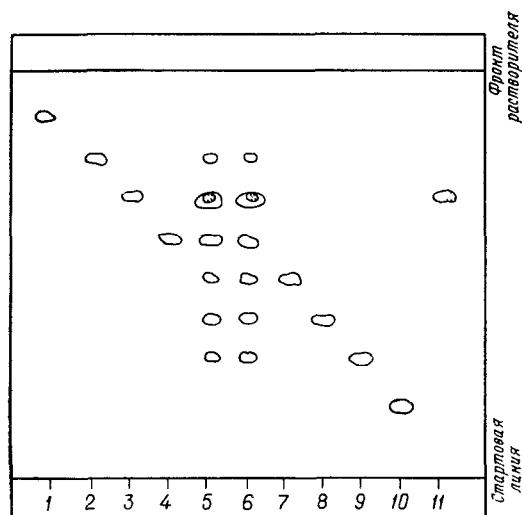


Рис. 14.1. Разделение липидов кожи: отделение жирных спиртов от их эфиров [21] (с разрешения авторов и Industrieverlag von Hernhausen K. G.).

Адсорбент: кизельгур G; вещество для пропитки: парафиновое масло (10 % в петролейном эфире с т. кип. 50—60 °С); элюирующий растворитель: 85 %-ная уксусная кислота; длительность разделения: 2,5 ч; обнаруживающий реагент: фосфомолибденовая кислота; количество анализируемого соединения: синтетические вещества всегда 2 мкг, неизвестные вещества всегда 10 мкг.

Выделенные спирты: 1 — лауриловый, 2 — миристиловый, 3 — пальмитиловый, 4 — стеариловый, 5 — жирный спирт кожи здорового человека, 6 — жирный спирт кожи больного человека, 7 — арахидовый, 8 — бегениловый, 9 — лигноцерилловый, 10 — церотиловый, 11 — олеиловый.

фосфомолибденовой кислотой или родамином В. Хашимото и Мукаи [22] проводили разделение высших спиртов на слоях силикагеля. Эти авторы установили, что лучшими растворителями для спиртов C_{10-18} являются смеси петролейный эфир—эфир (4:1), гексан—эфир (7:3), гексан—эфир—уксусная кислота (70:3:0,1) и ксилол—эфир (4:1). Этим методом были разделены китовый воск, головная фракция спермацетового масла, воск волос и пчелиный воск. Хашимото и др. [23] использовали также слои из активированной отбеленной земли. Рейнер [24] анализировал воска и смеси восков на слоях ди-

оксида кремния, элюируя их бензолом, а Колатукуди [25] изучал поверхностные липиды листьев гороха. Шольц [26] хроматографировал спирты и кислоты воска на силикагеле, пропитанном 0,5 %-ным раствором силиконового масла и 10 %-ным раствором тетрадекана в петролейном эфире. Соединения с 14—

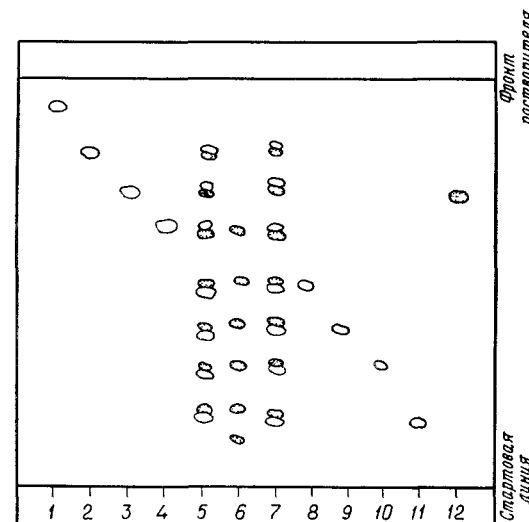


Рис. 14.2. Выделение жирных спиртов из липидов волос [21] (с разрешения авторов и Industrieverlag von Hernhausen K. G.).

Адсорбент: кизельгур G; вещество для пропитки: парафиновое масло (10 % в петролейном эфире с т. кип. 50—70 °С); элюирующий растворитель: 90 %-ный ацетон; длительность разделения: 2 ч; обнаруживающий реагент: фосфомолибденовая кислота; количество анализируемого соединения: синтетические вещества всегда 2 мкг, неизвестные вещества 10 мкг.

Выделенные спирты: 1 — лауриловый, 2 — миристиловый, 3 — пальмитиловый, 4 — стеариловый, 5 — жирные спирты из жирных эфиров волос, 6 — свободные жирные спирты из липидов волос, 7 — жирные спирты из жирных эфиров волос, 8 — арахидовый, 9 — бегениловый, 10 — лигноцерилловый, 11 — церотиловый, 12 — олеиловый.

24 атомами углерода разделяли при 42 °С 90 %-ной уксусной кислотой, насыщенной тетрадеканом, а соединения с 22—40 атомами углерода — при 60 °С смесью уксусная кислота—тетрадекан (96:4). Бандиопадхай и Чакрабарти [27] разделили 26 жирных спиртов C_7-C_{24} на кизельгуре G, пропитанном 10 %-ным жидким парафиновым маслом, элюируя пробу смесью ацетон—вода (3:1), 80 % которой предварительно насыщены жидким парафиновым маслом. Обнаружение осуществляли, нагревая пластинку при 110 °С после опрыскивания 1 %-ным спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты. Ацетаты удалось также разделить, используя смесь тех же растворителей (9:1).

Суббарао и др. [28] исследовали окисленные соединения жирного ряда, включая ряд спиртов, значения R_f которых приведены в табл. 14.3.

Таблица 14.3

Значение $R_f \times 100$ некоторых жирных спиртов, разделенных на силикагеле G (длина пути разделения 15 см) [28]

Спирт	Эфир — петролейный эфир		
	3 7	8 2	9 : 1
Стеариловый	72	96	93
Олеиловый	55		93
Ундециловый		89	
Рицинолеиловый	10		83
цис-9,10-Эпоксистеариловый	32		

Суббарао и Ахайя [29] разделили на силикагеле G 6-, 7-, (8-?), 9-, 10-, 12- и 18-оксизомеры стеариновых кислот, спиртов и сложных эфиров. Кислоты и спирты элюировали смесью диэтиловый эфир—петролейный эфир (2:3) с добавкой 2%-ной уксусной или муравьиной кислоты. При разделении метиловых эфиров соотношение растворителей было несколько другим (1:3); кислоту добавляли и в этом случае. Хара и др. [30] определяли методом ТСХ содержание молочной, яблочной и винной кислот. Швайгер [31] анализировал хроматографически молочную кислоту и другие карбоновые кислоты на слоях целлюлозы.

Морис и др. [32] выделили ненасыщенные оксикислоты из растительных масел. Сгута и Кумероу [33] разделяли некоторые оксистерариновые кислоты на силикагеле, используя смесь хлороформ—метанол—уксусная кислота (90:10:2).

2. РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ СПИРТОВ

Спирты разделяют также в виде их производных. Малин и др. [34, 35] описали методику хроматографического разделения нитратов. Получали нитраты следующим образом. «К абсолютному уксусному ангидриду (0,3 мл), помещенному в пробирку, приливали две капли 70%-ной азотной кислоты (около

0,05 мл). Раствор в это время охлаждали на ледяной бане. После того как температура реактива повышалась до комнатной, к нему добавляли около 50 мг оксисоединения или смеси оксисоединений. Полученный раствор выдерживали при этой температуре около 10 мин, охлаждали, доводили диэтиловым эфиром объем его до 5 мл». Полученный эфирный раствор непосредственно наносили на тонкослойные пластинки силикагеля и элюировали пробу *n*-гексаном. Для обнаружения хроматографических зон пластинку опрыскивали 2',7'-дихлорфлуоресцеином; пластинки рассматривали в УФ-свете или окрашивали хроматограммы парами иода.

Катц и Кини [36] использовали *n*-фенилазобензоаты для анализа жирных спиртов, получаемых при восстановлении сложных метиловых эфиров и природных глицеридов. Спирты этерифицировали свежеприготовленным 0,4%-ным (масса/объем) раствором *n*-фенилазобензоилхлорида в безводном эфире. Подобную этерификацию проводили следующим образом [36]. «В пробирку размером 150×18 мм помещали свободный длинноцепочечный спирт и добавляли к нему этерифицирующий раствор из расчета 2 мл раствора на 1 мг спирта. Для количества спирта, меньших 1 мг, всегда вводили 2 мл этерифицирующего раствора. На каждые 8 мг *n*-фенилазобензоилхлорида добавляли 25 мкг пиридина. Полученную смесь осторожно взбалтывали, тщательно закупоривали пробирки резиновыми пробками и выдерживали 30 мин в водяной бане при 34°C; толщина слоя воды в бане 13 мм. После окончания реакции эфир и пиридин отгоняли на паровой бане в токе газообразного азота». Остатки от приготовления фенилазобензоата удаляли гексаном и проводили предварительную его очистку; элюировали через колонку с оксидом алюминия смесью гексан—хлороформ (2,5:1). Тонкослойные пластинки готовят следующим образом. На пластинки наносят слой силикагеля G и активируют его, нагревая 2 ч при 115°C. После этого пластинки погружают на 5 мин в 5%-ный раствор *n*-додекана в *n*-гексане. После отгонки гексана на пластинки наносят раствор пробы в гептане и элюируют смесью ацетонитрил—бутанон-2 (8:2), насыщенной *n*-додеканом. Пятна становятся видимыми при опрыскивании 0,2%-ным раствором 2',7'-дихлорфлуоресцеина в спирте. При облучении пластинок длинноволновым УФ-светом на оранжевом фоне пластинки просматриваются пурпурные пятна эфиров. Если необходимо провести количественное определение, пятна элюируют и элюат пропускают через колонку с оксидом алюминия; элюируют пробу смесью гексан—хлороформ (2,5:1), чтобы очистить материал от 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Анализ осуществляют спектрофотометрически.

Хурачек и др. [37] разделяли спирты в виде N,N-диметил-*n*-аминофенилазобензоатов. Эти эфиры легко получить — этерифицирующий реагент устойчив и позволяет обнаружить менее 0,5 мкг соединения. Поскольку пятна окрашены, нет необходимости в применении специальных веществ для их обнаружения; интенсивность окраски пятен можно, однако, увеличить, опрыскивая пластинки 0,01 н. раствором серной кислоты. Авторы [37] приводят значения R_f для 15 производных и 8 систем растворителей; не все соединения удается разделить с помощью одних и тех же растворителей.

В ряде работ [33—45] описано разделение методом ТСХ 3,5-динитробензоатов спиртов. Мелитц и др. [46] применили эти производные, чтобы отделить насыщенные спирты от ненасыщенных. Шантц и др. [43] проанализировали группу динитрофенилбензоатов терпеновых спиртов.

Липина [47, 48] использовала 3,5-динитробензоаты для обнаружения паров бутилового и изооктилового спиртов в воздухе. Пары спирта поглощали из воздуха силикагелем, далее 100 мг силикагеля обрабатывали 6 мл бензола, чтобы извлечь спирты. Выделенные спирты этерифицировали и эфиры разделяли на слоях силикагеля, применяя в качестве элюента 7—10 %-ный раствор диэтилового эфира в бензине. В работе [39] приведена методика приготовления динитробензоата. Определенное количество спирта кипятят 30—60 мин в колбе с обратным холодильником при небольшом избытке 3,5-динитробензоилхлорида в 10 мл бензола, к которому добавляют 0,1 мл сухого пиридина. После охлаждения реакционную смесь последовательно экстрагируют 25 мл 0,1 н. серной кислоты, 25 мл 0,5 %-ного раствора карбоната натрия и водой. Бензольный раствор сушат небольшим количеством безводного сульфата натрия и концентрируют до нескольких миллилитров. Величины R_B (отношение R_f динитробензола к R_f цинкового желтого) приведены для серии спиртов в табл. 14.4.

Фамос и соавторы определяли высшие спирты [49] и метанол [50] в этаноле в виде 2,4-динитробензоатов. Применяя реактив Т-246 (см. гл. 7), можно определить 0,04 мкг метанола.

В ряде работ описано разделение спиртов методом ТСХ в виде 2,4-динитробензолсульфонатов [51], ксантогенатов [52], ацетатов [53], *n*-нитробензоатов [54], β -алкоксипропионитрилов [55], динитрофенолятов [56], N-(1-фенилэтил)уретанов [57], α -нафтилуретанов [54] и *n*-толуолсульфонатов (тозилатов) [58].

Помонис и др. [58] разработали пробу на спирты, основанную на реакции 4-(*n*-нитробензил)пиридина с тозилатами (реактив Т-182); на слоях целлюлозы чувствительность определения составляет величину порядка микрограмма.

Таблица 14.4

Величины R_B (R_f/R_f цинкового желтого) некоторых 3,5-динитробензоатов спиртов

Спирт	R_B^a					
	А [41]	Б [41]	В [41]	Г [41]	Д [40]	Е [40]
Метанол	0,44	0,42	0,44	0,70		
Этанол	0,63	0,61	0,59	0,77		
Пропанол-1	0,78	0,75	0,74	0,88	0,68	2,01
Пропанол-2	0,84	0,78	0,76	0,88	0,79	2,08
Бутанол-1	0,94	0,87	0,84	0,96	0,82	1,90
Бутанол-2					0,92	2,02
Изобутанол	0,96	0,86	0,81	0,98		
2-Метилбутанол-1					1,01	1,76
3-Метилбутанол-1	1,06	0,94	0,92	1,02	0,96	1,84
Пентанол-1	1,00	0,98	—	1,03	0,96	1,71
Пентанол-2	1,17	1,02	1,02	1,11	1,05	1,89
Пентанол-3					1,05	1,91
2-Метилпентанол-1	1,13	1,01	1,01	1,10		
2,4-Диметилпентанол-1	1,13	1,04	1,01	1,10		
Гексанол-1	1,11	0,95	0,99	1,08	1,04	1,57
Гексен-1-ол-3					0,94	1,73
Гептанол-1	1,13	1,02	1,02	1,09	1,08	1,42
Гептанол-2	1,17	1,12	1,08	1,13	1,15	1,77
Гептанол-3	1,26	1,18	1,14	1,17		
Гептанол-4					1,42	1,72
Октанол-1	1,22	1,03	1,07	1,15	1,15	1,28
Октанол-2					1,23	1,54
Нонанол-1					1,19	1,17
Деканол-1	1,27	1,10	1,10	1,21	1,24	1,03
Ундеканол-1					1,28	0,91
Додеканол-1	1,27	1,10	1,10	1,21	1,35	0,78
Фенилэтиловый					0,61	1,54
Коричный					0,66	1,31
α -Терпинеол					1,15	1,17

Продолжение табл. 14.4

Спирт	R_f^a					
	A [41]	B [41]	B [41]	Г [41]	Д [40]	Е [40]
Гераниол					1,04	1,44
Лимонный					1,08	1,40
Линалоол					1,07	1,46
Ментол					1,46	1,44

^a Адсорбенты и растворители: А — силикагель G, циклогексан—этилацетат (9:1); В — силикагель G, циклогексан—метилацетат (9:1); В — силикагель G, четыреххлористый углерод—циклогексан—этилацетат (80:15:5); Г — силикагель, бензол—циклогексан (9:1); Д — силикагель G, бензол—петролейный эфир (38—50°C) (1:1); Е — полиамид, метанол—вода (9:1)

3. ГЛИКОЛИ

Райт [59] опубликовал метод обнаружения увлажнителей в табаке методом ТСХ на силикагеле, активированном в течение часа при 110°C. Проводится этот анализ следующим образом. Сигарету погружают на 30 мин в 5 мл воды, далее взвесь центрифугируют. На слой силикагеля наносят 4 мкл экстракта и элюируют пробу ацетоном или смесью бутанол—ацетон—вода (4:5:1). Для первого элюента получены такие значения R_f : этандиол 0,49; пропандиол-1,2 0,61; бутандиол-2,3 0,68; глицерин 0,30. Для второго элюента R_f этих же гликолей и глицерина соответственно равны: 0,54; 0,60; 0,64 и 0,49. При опрыскивании 1 %-ным раствором тетраацетата свинца в сухом бензоле удается обнаружить 20 мкг гликолей и 1 мкг глицерина. Анализируемые вещества обнаруживаются на коричневом фоне в виде белых пятен и становятся более заметными после 5-минутного нагревания при 110°C. Разработан еще один метод обнаружения, чувствительность которого столь же высока. Этот метод предусматривает 3-кратное последовательное опрыскивание пластинки 0,5 %-ным периодатом калия, 5 %-ным иодидом калия и, наконец, раствором крахмала.

Кучера [3] разделял некоторые гликоли на незакрепленных слоях оксида алюминия со степенью активности (по Брокману) III и IV; элюентами служили смеси гексан—ацетон (4:1) или эфир—этанол (99:1), насыщенный водой. Для обнаружения был использован ряд реактивов; большая чувствительность достигается при 30—60-минутном экспонировании пластинок при

20°C с последующим выдерживанием на воздухе до исчезновения коричневого фона. Этот метод, однако, менее чувствителен, чем упомянутая выше реакция с тетраацетатом свинца. Минимальное количество пропандиола-1,2, определяемое одной пробой, составляет 20 мкг. В табл. 14.5 приведены значения R_f для этих соединений. Согласно Кучере, «отделение 1,2-гликолей от других гликолей с близкими значениями R_f можно легко осуществить на оксиде алюминия, пропитанном 3 %-ным боратом аммония; при этом величины R_f 1,2-гликолей существенно зани-

Таблица 14.5
Величины $R_f \times 100$ некоторых полиспиртов

Спирт	Оксид алюминия G, CHCl ₃ —C ₂ H ₅ CH ₂ — —HCOOH (80:17:3) [60]	Силикагель G		Полиамид — пропи- таный кселегур, CHCl ₃ [60]	Незакрепленный слой оксида алюминия, (C ₂ H ₅) ₂ O—C ₂ H ₅ OH (99:1), насыщ. H ₂ O [6]
		H-C ₂ H ₅ OH, насыщ. 1,5 н. NH ₄ OH [60]	ацетон—H ₂ O (49:1) [61]		
Пентаэритрит	0	27		0	
Глицерин	2	31	52	16	
Тетрамилциклогексанол	4	47		9	
2,2-бис-(Оксиметил)про- панол-1	12	57		19	
Этиленгликоль	13	56	74	52	25
2,2-бис-(Оксиметил)бу- танол-1	19	66		29	
Пропандиол-1,3	26	64	80	55	
Диэтиленгликоль	33	52	65	92	
Бутандиол-1,4	35	77	85	45	47
Пропандиол-1,2	36	67	82	72	38
Триэтиленгликоль	40	42	60	94	
Гександиол-1,6	42	77		68	
Бутандиол-1,3	50	77	88	84	55
2,2-Диметилпропан- диол-1,3	60	87		80	
Бутандиол-2,3	—	—		—	62
Пентандиол-1,5	—	—		—	63
Дипропилен ликоль-1,2	66	72		91	
Гексантриол-1,2,6	75	83		62	
2-Метилпентандиол-2,4	80	90		93	84

жены, по-видимому, из-за образования комплексов с борной кислотой».

Кнаппе и др. [60] разделили 17 промышленно важных многоатомных спиртов на трех различных системах тонких слоев (табл. 14.5). Чтобы приготовить пропитанный кизельгур G, вымачивают 5 г полиамида (Ultramid 1C) в 60 мл смеси бензол—метанол (1:1), нагревают на негорячей водяной бане до образования однородного раствора и затем тщательно перемешивают с 30 г кизельгура G в фарфоровой ступке. Полученную смесь наносят на пластинки и сушат 30 мин при 105°C. Для обнаружения пятен используют ряд реактивов, представляющих собой сильные окислители и ароматические диамины.

Нисбет [61] разделял многоатомные спирты, элюируя их смесью ацетон—вода [49] на силикагеле. Ему также удалось дифференцировать соединения с близкими значениями R_f : при опрыскивании реактивом T-257 пятна их окрашиваются по-разному.

Сехер [62, 63] разделил некоторые полиглицерины, элюируя их смесью этилацетат—изопропанол—вода (65:22,7:12,3). Разделение он проводил на слоях силикагеля G, смешанного с 0,02 M раствором ацетата натрия и высушенного в течение 1—1,5 ч при 105°C.

Бергельсон и др. [64] использовали серию из четырех растворителей для разделения на слоях силикагеля 9 соединений, содержащих α -гликольные группы. Полученные при этом значения R_f опубликованы отдельно. Эти же авторы [66] осуществили разделение методом нисходящей тонкослойной хроматографии полиоксисоединений. Хроматографирование велось на тонком слое целлюлозы с тремя различными системами растворителей: бутанол—пиридин—вода (10:3:3), бутанол—25 %-ный раствор гидроксида аммония—вода (16:1:2) и фенол—бутанол—уксусная кислота—вода (5:5:2:10). Для диоксикислот применяли смесь бутанол—8 %-ный раствор гидроксида аммония—водный раствор буры (8:1:2).

Грасхоф [13] анализировал гликоли на слоях силиката магния, элюируя хроматограммы смесью *n*-пропанол—вода—хлороформ (6:2:1). Для обнаружения он применял 1 %-ный водный раствор перманганата калия.

Морис [67] исследовал разделение метиловых эфиров полиоксикислот и показал, что пропитка слоев силикагеля реактивом, образующим комплексы с гликолем, улучшает разделение. Так, на слоях силикагеля, пропитанного борной кислотой, боратом или арсенитом натрия, можно дифференцировать *трео*- и *эритро*-изомеры диоксикислот, а на слоях силикагеля, пропитанного арсенитом натрия, удается разделить три- и тетраоксистеараты.

В работе [9] описано разделение ряда гликолей на слоях оксида алюминия. Элюентом служила смесь эфир—бензол, обнаруживающим агентом—пары иода.

Суббарао и Ахайя [29] использовали метод ТСХ для разделения ряда оксипроизводных касторового масла—ундецилового спирта, диоксиундекана, триоксиундекана и моноглицерида ундециленовой кислоты. Было достигнуто четкое разделение по числу гидроксильных групп.

Громатка и Ауэ [68] подвергли хроматографическому разделению этиленгликоль, пропиленгликоль-1,3, гександиол-1,6, гептандиол-1,7, нонандиол-1,9, декандиол-1,10 и тридекандиол-1,13 на силикагеле G. Элюирование велось абсолютным этанолом, обнаружение—раствором перманганата калия. Авторы [68] наблюдали линейную зависимость между $\lg R_f$ и числом углеродных атомов. Если откладывать по оси ординат $\lg R_f$, а по оси абсцисс число атомов углерода, то получатся две прямые линии—одна для нечетных, а другая для четных чисел атомов углерода.

Симоне и Вицедомини [69] сравнили значения R_f 10 многоатомных спиртов, включая восстановленные сахара, в 7 системах растворителей на необработанном силикагеле и на силикагеле, пропитанном нитратом свинца. На обработанных слоях силикагеля подвижность полиолов уменьшается с увеличением числа соседних гидроксильных групп. Сахасрабудхе [70] изучал разделение полиолов и их сложных эфиров на силикагеле, пропитанном 4 %-ным раствором борной кислоты; в качестве элюента он выбрал смесь бензол—метанол (8:3).

Полиоксиэтиленгликоли разделяли на силикагеле, используя следующие растворители: этанол—метанол—аммиак (12:4:2 или 12:3:2), этанол—метанол—вода (12:4:2) [71], толуол—этилацетат (4:6), метилэтилкетон—вода—уксусная кислота (95:4:1), бутанол—метанол—вода—уксусная кислота (77:13:8:2) [72]; при разделении на диоксиде кремния, пропитанном ацетатом натрия, применяли смесь этилацетат—изопропанол—вода (65:23:12) [73]; на оксиде алюминия элюировали смесью хлороформ—этанол (98:2) [74]; на смешанном слое кизельгур—силикагель (1:1), приготовленном с 0,5 %-ным раствором метабисульфата натрия, линейные полимеры с большей молекулярной массой элюировали смесью этилацетат—изопропанол—ацетон—метанол—вода (50:15:15:4:16) [75]; на смешанном слое кизельгур—диоксид кремния (1:1), приготовленном на 0,045 M растворе хлорида кальция, нелинейные изомеры отделяли от линейных соединений с меньшей молекулярной массой, элюируя их смесью этилацетат—изопропанол—вода (110:61:29) [75]. Эти соединения можно отделить от полисор-

батов на силикагеле G, элюируя их смесью метанол—хлороформ—уксусная кислота (5:4:2) [76].

Кремер [77] разделил группу изомерных пентитов и гекситов на целлюлозе MN300, проводя элюирование смесями метилэтилкетон—уксусная кислота—0,75 M борная кислота (40:10:9), *n*-бутанол—0,75 M борная кислота (85:15) и изопропанол—уксусная кислота—0,75 M борная кислота (7:1:2).

Количественно глицерин определяли полярографически после отделения от олигоглицеринов методом ТСХ [78]. Его можно также определить спектрофотометрически с хромотропной кислотой после элюирования водой и последующего окисления иодатом калия [79].

Гликоли можно также разделять в виде их производных. Полиэтиленгликоли и сложные моноэфиры этиленгликолей разделяли методом ТСХ на кизельгуре, пропитанном 20 %-ным раствором формамида в ацетоне [80]. В качестве связующего для слоев применяли аравийскую камедь.

Полиолы можно разделить в виде ацетатов на силикагеле, элюируя смесью бензол—этилацетат—этанол (89:10:1) [81], или на смеси кизельгур G—силикагель G (1:1), элюируя сме-

Таблица 14.6

Величины $R_f \times 100$ бутин-2-диолов-1,4 на силикагеле [89] а, б

Соединение	Бензол	Хлороформ	Изопропиловый эфир—изооктан (1:1)	Изопропиловый эфир	Этилацетат—изооктан (1:1)
Бутин-2-диол-1,4	0	0	0	5	8
Моноформиат	0	4	7	24	28
Диформиат	12	27	24	48	51
Моноацетат	0	4	7	20	27
Диацетат	8	22	23	41	48
Монопропионат	0	4	10	28	34
Дипропионат	13	27	38	59	60
Монобутират	3	4	13	32	38
Дибутират	18	36	45	64	65
Моновалериат	3	5	14	35	40
Дивалериат	23	44	51	69	69

^а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

^б Длина пути разделения 15 см. Температура $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Все величины R_f — среднее трех измерений. Камера для разделения выстлана бумагой.

сью циклогексан—эфир—этанол—уксусная кислота (5:51:3:1) [82]. В работах [83, 84] описано разделение полиолов в виде триметилсилильных производных. Тома и др. [85] анализировали группы полиэтиленгликольстеаратов методом двумерного хроматографирования на силикагеле. В одном направлении пробу элюировали смесью *n*-бутанол—этанол—25 %-ный раствор аммиака (14:3:5), в другом — смесью хлороформ—метанол—вода (3:25:5). Тома и др. [85] для групп полиэтиленгликольстеаратов на силикагеле проводили двумерное разделение. Растворителем в первом направлении была смесь *n*-бутанол—этанол—25 %-ный аммиак (14:3:5). Фавретто и др. [86—88] исследовали большое число производных для определения молекулярно-массового распределения полиэтиленгликолей.

Нэфф и др. [89] разделили 2-бутиндиол-1,4 и его моно- и диэфиры муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной и валеариановой кислот методом ТСХ на пластинках силикагеля. В качестве систем растворителей-элюентов эти авторы использовали бензол, хлороформ, изопропиловый эфир, изопропиловый эфир—изооктан (1:1) и этилацетат—изооктан (1:1). Величины R_f приведены в табл. 14.6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Purdy S. J., Truter E. V., J. Chromatogr., 14, 62 (1964).
2. Attaway J. A., Wolford R. W., 5th International Symposium on Gas Chromatography, Brighton, England, September, 1964.
3. Kučera J., Collect. Czech. Chem. Commun., 28, 1341 (1963).
4. Singh E. J., Gershbein L. L., J. Chromatogr., 23, 180 (1966).
5. Nobuhara A., J. Chromatogr., 30, 235 (1967).
6. Melkonyan S. A., Grigoryan L. G., Zhamagortsyan V. N., Vartanyan S. A., Arm. Khim. Zh., 19, 199 (1966).
7. Hashimoto A., Hirotsuni A., Mukai K., Yukagaku, 15, 206 (1966); through Chem. Abstr., 65, 3726b (1966).
8. Morris L. J., Wharry D. M., Hammond E. W., J. Chromatogr., 33, 471 (1968).
- 8a. Dunphy P. J., Kerr J. D., Penneck J. F., Whittle K. J., Chem. Ind. (London), 1966, 1549.
9. Ахрем А. А., Кузнецова А. И., Титова Я. А., Левина И. С., Изв. АН СССР, отд. хим. наук, 1962, 657.
10. Wassermann L., Hanus H., Naturwissenschaften, 50, 351 (1963).
11. Prey V., Berbalk H., Kausz M., Mikrochim. Acta, 1962, 449.
12. Grasshof H., J. Chromatogr., 14, 513 (1964).
13. Grasshof H., Deut. Apoth.-Ztg., 103, 1396 (1963).
14. Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., J. Chromatogr., 11, 479 (1963).
15. Waldi D., J. Chromatogr., 18, 417 (1965).
16. Castagnola V., Boll. Chim. Farm., 102, 784 (1963).
17. Valentini G., Renzo M., Ind. Aliment. (Pinerolo, Italy), 7, 73 (1968).
18. Hara S., Takeuchi M., J. Chromatogr., 11, 565 (1963).
19. Kazuno T., Hoshita T., Steroids, 3, 55 (1964).
20. Kaufmann H. P., Das B., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 398 (1963).

- 21 Kaufmann H P, Viswanathan C V, Fette, Seifen, Anstrichm, **65**, 607 (1963)
- 22 Hashimoto A, Mukai K, Yukagaku, **12**, 613 (1963), through Chem Abstr, **60**, 9883 (1964)
- 23 Hashimoto A, Hirota A, Mukai K, Yukagaku, **14**, 343 (1965)
- 24 Reutner F, Fette, Seifen, Anstrichm, **70**, 162 (1968)
- 25 Kolattukudy P E, Lipids, **5**, 398 (1970)
- 26 Scholz G H, Fette, Seifen, Anstrichm, **69**, 333 (1967)
- 27 Bandyopadhyay C, Chakrabarty M M, J Chromatogr, **32**, 297 (1968)
- 28 Subbarao R, Roomi M W, Subbaram M R, Achaya K T, J Chromatogr, **9**, 295 (1962)
- 29 Subbarao R, Achaya K T, J Chromatogr, **16**, 235 (1964)
- 30 Hara S, Morinaga K, Otsuka K, Hakko Kogaku Zasshi, **42**, 426 (1964)
- 31 Schweiger A, Z Lebensm Unters-Forsch, **124**, 20 (1963)
- 32 Morris L J, Holman R T, Fontell K, J Am Oil Chem Soc, **37**, 323 (1960)
- 33 Sgoutas D, Kummerow F A, J Am Oil Chem Soc, **40**, 138 (1963)
- 34 Malins D C, Wekell J C, Houle C R, Anal Chem, **36**, 658 (1964)
- 35 Wekell J C, Houle C R, Malins D C, J Chromatogr, **14**, 529 (1964)
- 36 Katz K, Keeney M, Anal Chem, **36**, 231 (1964)
- 37 Churáček J, Huškova M, Pechová H, Riha J, J Chromatogr, **49**, 511 (1970)
- 38 Labat L, Montes A L, An Asoc Quim Arg, **41**, 166 (1953), Chem Abstr, **48**, 3637 (1954)
- 39 Dhont J H, Rooy de C, Analyst (London), **86**, 527 (1961)
- 40 Minyard J P, Tumlinson J H, Thompson A C, Hedin P A, J Chromatogr, **29**, 88 (1967)
- 41 Severin M, J Chromatogr, **26**, 101 (1967)
- 42 Diemair W, Pfeilstucker K, Hoelscher I, Z Anal Chem, **234**, 418 (1968), also J Chromatogr, **39**, D11 (1968)
- 43 v Schantz M, Juvonen S, Oksanen A, Hakamaa I, J Chromatogr, **38**, 364 (1968)
- 44 Canic V D, Persic Janjic N V, Babin M J, Z Anal Chem, **264**, 415 (1973)
- 45 Vamos J, Bratner A, Int Symp Chromatogr Electrophor, Lect Pap, 6th, 1970, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich, 1971, p 228
- 46 Mehlitz A, Gierschner K, Minas T, Chem-Ztg, **89**, 175 (1965)
- 47 Липина Т Г, Методы определения вредных веществ в воздухе — М 1961, 41
- 48 Липина Т Г, Завод лаб, **26**, 55 (1960)
- 49 Vamos J, Bratner A, Szasz G, Vegh A, Acta Pharm Hung, **40**, 135 (1970)
- 50 Vamos J, Bratner A, Szasz G, Vegh A, Acta Pharm Hung, **38**, 135 (1970)
- 51 Leiebvre G, Berthelin J, Maugras M, Gay R, Urion E, Bull Soc Chim Fr, **1966**, 266
- 52 Roehr M, Chauri D, Microchim Acta, **1967**, 137
- 53 Takahashi T, Schmid H H O, Chem Phys Lipids, **4**, 243 (1970)
- 54 Connell D W, Strauss C R, J Chromatogr, **72**, 391 (1972)
- 55 Бузланова М М, Ульянова В Н, Огтепперанская С И, Журн анал химии, **23**, 1425 (1968)
- 56 Parihar D B, Sharma S P, Tewari K C, J Chromatogr, **21**, 261 (1966)
- 57 Freytag W, Ney K H, J Chromatogr, **41**, 473 (1969)
- 58 Potomus J G, Stevenson R F, Freeman P J, J Chromatogr, **40**, 78 (1969)
- 59 Wright J, Chem Ind (London), **1963**, 1125
- 60 Knappe E, Peteri D, Rohdewald I, Z Anal Chem, **199**, 270 (1963)
- 61 Nisbet M A, Analyst (London), **1969**, 811
- 62 Seher A, Fette, Seifen, Anstrichm, **67**, 24 (1965)
- 63 Seher A, Fette, Seifen, Anstrichm, **66**, 371 (1964)
- 64 Бергельсон Л Д, Дьятловитская Е В, Воронкова В В, Докл АН СССР, хим секция, **141**, 1076 (1966)
- 65 Бергельсон Л Д, Дьятловитская Е В, Воронкова В В, Докл АН СССР, **141**, 84 (1961)
- 66 Бергельсон Л Д, Дьятловитская Е В, Воронкова В В, Докл АН СССР, **149**, 1319 (1963)
- 67 Morris L J, J Chromatogr, **12**, 321 (1963)
- 68 Hromatka O, Aue W A, Monatsh Chem, **93**, 503 (1962)
- 69 De Simone V, Vicedomini M, J Chromatogr, **37**, 538 (1968)
- 70 Sahasrabudhe M R, J Am Oil Chem Soc, **44**, 376 (1967)
- 71 Obruba K, Collect Czech Chem Commun, **27**, 2968 (1962), through Chem Abstr, **58**, 9337 (1963)
- 72 Falgoux D, Mangin P, Engel J, Granger C, Z Anal Chem, **236**, 228 (1968)
- 73 Gerhardt W, Holzbauer R, Chromatographia, **2**, 468 (1969)
- 74 Вахтина И А, Окунев П А, Тараканов О Г, Журн анал химии, **21**, 630 (1966)
- 75 Dallas M J S, Stewart M F, Analyst (London), **92**, 634 (1967)
- 76 Thakkar A L, Kuehn P B, Hall N A, Am J Pharm, **139**, 122 (1967)
- 77 Kremer B P, J Chromatogr, **110**, 171 (1975)
- 78 Jaworski M, Bogaczek J, Walczyk K, Chem Anal (Warsaw), **14**, 313 (1969)
- 79 Coupek J, Pokorny S, Mares E, Zezulkova L, Luan N-T, Ptkorný J, J Chromatogr, **120**, 411 (1976)
- 80 Gauthier H, Mangency G, J Chromatogr, **14**, 209 (1964)
- 81 Dumazert C, Ghughione C, Pignet T, Bull Soc Pharm Marseille, **12**, 337 (1963)
- 82 Dallas M S J, J Chromatogr, **48**, 225 (1970)
- 83 Gregory N L, J Chromatogr, **36**, 342 (1968)
- 84 Leibman K C, Ortiz E, J Chromatogr, **32**, 757 (1968)
- 85 Thoma K, Rombach R, Ullmann E, Arch Pharm (Weinheim, Ger), **298**, 19 (1965)
- 86 Favretto L, Pertoldi G Marletta, Favretto Gabrielli L, J Chromatogr, **46**, 255 (1970)
- 87 Favretto L, Pertoldi G Marletta, Favretto Gabrielli L, J Chromatogr, **50**, 304 (1970)
- 88 Favretto L, Favretto Gabrielli L, Pertoldi Marletta G, J Chromatogr, **66**, 167 (1972)
- 89 Naff M, Naff S, Strite J. A, J Chromatogr, **11**, 496 (1963)

1. СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Быстрота проведения анализа методом ТСХ во многих случаях имеет очень большое значение [1]. В частности, этот метод можно использовать в токсикологии, так как он позволяет выделить и идентифицировать алкалоиды всего за 30—60 мин [2—4], а для проведения тех же самых анализов методом хроматографии на бумаге необходимо 12—24 ч.

Фарнворс и Эйлер [5] разработали метод простого и быстрого обнаружения алкалоидов в 2-граммовых пробах растительных материалов. Чтобы удалить пигменты, мешающие определению, проводят предварительную экстракцию и очистку и полученные в результате экстракты наносят на тонкие слои силикагеля G. После разделения смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1) пластинки опрыскивают реактивом Драгендорфа, усовершенствованным Мюнье и Машенбефом [6]. Метод был проверен на 28 алкалоидсодержащих растениях и 8 растениях, не содержащих алкалоиды; последние определения проводились в качестве контрольных. Поскольку реактив Драгендорфа способен реагировать с некоторыми соединениями, не относящимися к алкалоидам, две из восьми контрольных проб дали неправильные результаты: показали наличие алкалоидов. Это обстоятельство, однако, нельзя расценивать как серьезный недостаток метода. Нето и Манчини [7] предложили несколько иной метод экстракции для быстрого обнаружения алкалоидов. Буш и Джеффри [8] пользовались методом, который требует довольно много времени. Они проводили перколяцию алкалоидов метанолом, после чего извлекали алкалоиды из раствора ионообменными смолами, которые перед элюированием алкалоидов промывали, чтобы удалить пигменты, мешающие анализу.

Уолди и др. [9] разработали методику определения алкалоидов тонкослойным хроматографированием. В соответствии с этой методикой алкалоиды сначала делят на две группы. Для этого алкалоиды повышенной концентрации (анализуемый раствор должен содержать от 0,05 до 5% алкалоидов) наносят на пластинки с силикагелем G одновременно с родамином B или раствором резерпина в качестве стандарта. Разделение проводят

смесью циклогексан—хлороформ—диэтиламин (5:4:1). После этого пластинки сушат на воздухе, рассматривают в УФ-свете при 365 мкм и опрыскивают раствором иодоплатината. Соединения с $R_f < 0,30$ относят к группе I, а соединения с $R_f > 0,30$ — к группе II (табл. 15.1 и 15.2). Алкалоиды группы I подвергают хроматографическому разделению на силикагеле G, используя смеси хлороформ—ацетон—диэтиламин (5:4:1) и хлороформ—диэтиламин (9:1). Идентификацию соединений проводят следующим образом: сравнивают значения R_f и окраску пятен в УФ-свете после опрыскивания реактивом иодоплатината с приведенными в табл. 15.1 и 15.2. Для облегчения идентификации в случае необходимости хроматографирование можно вести, используя другие системы, на оксиде алюминия G или щелочном силикагеле G (приготовленном с 0,1 н. раствором гидроксида натрия вместо воды); в первом случае элюентом служит хлороформ, во втором — метанол.

Чтобы облегчить идентификацию, алкалоиды группы II разделяют на слоях силикагеля G смесями циклогексан—диэтиламин (9:1) и (или) бензол—этилацетат—диэтиламин (7:2:1). И в этом случае окраску пятен и значения R_f сравнивали с соответствующими величинами, приведенными в табл. 15.1 и 15.2.

Величины R_f для 54 алкалоидов (табл. 15.1) приведены для ряда разделительных систем, и в сомнительных случаях можно воспользоваться любым дополнительным значением R_f . Рекомендуется также нанести несколько пятен пробы так, чтобы можно было применить другие хорошо известные реактивы для алкалоидов. Байулеску и Константилеску [10] перечисляют некоторые реакции, позволяющие осуществить микроопределение алкалоидов *in situ*, и приводят результаты определения 17 соединений. Авторы работы [11] также разработали методику систематического анализа 34 алкалоидов и некоторых аммониевых оснований.

Тейшер и др. [12] обсудили вопрос о применении тонких слоев для разделения различных групп алкалоидов.

Мюле [13] разработал способ количественной экстракции и определения наркотических анальгетиков в продуктах жизнедеятельности человека с применением УФ-спектрофотометрии, ТСХ и газовой хроматографии. Таким способом было определено 31 соединение, включая опийные алкалоиды.

Тийак и Хелд [14] в своем обзоре по фармакологии алкалоидов, охватывающем период вплоть до 1969 г., приводят 103 ссылки на работы, в которых ТСХ использовали для определения алкалоидов в лекарственных препаратах. В библиографию обзора по ТСХ алкалоидов [14а] включено 1050 публикаций, охватывающих тот же период. В статьях [15, 16] анализируются случаи неправильного употребления ряда лекарств,

Таблица 15.1

Величины R_f некоторых алкалоидов [9] а, б

Алкалоид	Силикагель G					Оксид алюминия G		Силикагель, приготовленный с 0,1 н. NaOH
	хлороформ—этилдиэтиламин (5:4:1)	хлороформ—диэтиламин (9:1)	циклогексан—хлороформ—диэтиламин (3:4:1)	циклогексан—диэтиламин (9:1)	бензол—этилдиэтиламин (7:2:1)	хлороформ	циклогексан—хлороформ—диэтиламин (3:7:0,5%-ный диэтиламин)	
<i>Группа I</i>								
Нарценин	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Купреин	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46
Сарпагин	0,12	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Эргометрин	0,14	0,06	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,64
Морфин	0,10	0,08	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00	0,34
Дигидроэрготамин	0,21	0,12	0,00	0,00	0,03	0,07	0,00	0,61
Серпентин	0,24	0,15	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
Эрготамин	0,24	0,16	0,00	0,00	0,03	0,10	0,05	0,59
Болдин	0,16	0,16	0,03	0,00	0,05	0,24	0,06	0,58
Дигидроморфинон	0,24	0,23	0,08	0,01	0,11	0,05	0,08	0,16
Эрогметринин	0,42	0,25	0,03	0,00	0,08	0,12	0,10	0,62
Эфедрин ^в	—	—	—	—	—	—	—	—
Хинин	0,19	0,26	0,07	0,00	0,17	0,09	0,18	0,43
Дигидроэргокристин	0,42	0,30	0,03	0,00	0,07	0,15	0,07	0,69
Горденин	0,33	0,36	0,14	0,05	0,28	0,00	0,15	0,35
Эргокристин	0,51	0,38	0,14	0,05	0,13	0,46	0,15	0,70
Хинидин	0,33	0,40	0,15	0,00	0,25	0,12	0,18	0,50
Атропин	0,38	0,40	0,16	0,05	0,12	0,00	0,10	0,17
Кольхицин	0,47	0,41	0,04	0,00	0,04	0,11	0,00	0,57
Аймалин	0,47	0,42	0,12	0,03	0,30	0,06	0,13	0,56
Цинхонин	0,38	0,44	0,17	0,07	0,27	0,00	0,22	0,40
Гоматропин	0,37	0,45	0,15	0,05	0,23	0,04	0,24	0,15
Эрготаминин	0,24	0,51	0,00	0,00	0,14	0,42	0,15	0,68
Пилокарпин	0,41	0,52	0,09	0,00	0,13	0,32	0,25	0,55
Кодеин	0,38	0,53	0,16	0,04	0,26	0,12	0,27	0,35
Дигидрокодеин	0,38	0,54	0,18	0,06	0,28	0,10	0,30	0,25

Продолжение табл. 15.1

Алкалоид	Силикагель G					Оксид алюминия G		Силикагель, приготовленный с 0,1 н. NaOH
	хлороформ—этилдиэтиламин (5:4:1)	хлороформ—диэтиламин (9:1)	циклогексан—хлороформ—диэтиламин (3:4:1)	циклогексан—диэтиламин (9:1)	бензол—этилдиэтиламин (7:2:1)	хлороформ	циклогексан—хлороформ—диэтиламин (3:7:0,5%-ный диэтиламин)	
Серпентинин ^в	0,53	0,56	0,08	0,00	0,10	0,00	0,03	0,12
Эргокристинин	0,61	0,57	0,13	0,00	0,20	0,00	0,27	0,70
Скополамин	0,56	0,60	0,19	0,03	0,34	0,30	0,00	0,52
Иохимбин	0,63	0,62	0,18	0,03	0,37	0,33	0,15	0,60
Бруцин	0,42	0,63	0,18	0,00	0,19	0,50	0,54	0,12
Цефаелин	0,56	0,63	0,19	0,02	0,23	0,25	0,17	0,37
Раувольцин	0,55	0,63	0,18	0,04	0,36	0,36	0,15	0,68
Дигидрокодеинон	0,51	0,65	0,21	0,04	0,30	0,48	0,43	0,18
Апоатропин	0,54	0,67	0,40	0,20	0,26	0,15	0,40	0,16
Стрихнин ^в	0,53	0,76	0,28	0,05	0,38	0,57	0,60	0,22
Резерпин	0,72	0,80	0,20	0,00	0,46	0,63	0,35	0,69
<i>Группа II</i>								
Физостигмин	0,65	0,9	0,32	0,04	0,44	0,59	0,50	0,46
Аконитин	0,68	0,9	0,35	0,03	0,49	0,36	0,60	0,65
Бульбокапнин	0,65	0,9	0,35	0,07	0,54	0,78	0,70	0,48
Эметин	0,67	0,9	0,40	0,06	0,45	0,38	0,58	0,50
Папаверин	0,67	0,9	0,42	0,03	0,47	0,85	0,84	0,70
Котарин ^в	0,60	0,9	0,43	0,31	0,45	0,00	0,25	0,00
Скополин	0,60	0,9	0,44	0,20	0,44	0,46	0,50	0,37
Лобелин	0,68	0,9	0,48	0,14	0,48	0,55	0,60	0,55
Наркотин	0,72	0,9	0,51	0,10	0,57	0,81	0,79	0,72
Тебаин	0,65	0,9	0,51	0,16	0,50	0,71	0,76	0,40
Аспидоспермин	0,65	0,9	0,54	0,20	0,49	0,50	0,60	0,65
Тропакокаин	0,65	0,9	0,56	0,34	0,45	0,58	0,78	0,35
Ареколин	0,66	0,9	0,56	0,34	0,48	0,00	0,00	0,00
Гидрастинин ^в	0,66	0,9	0,58	0,41	0,50	0,00	0,25	0,00
Неопсикаин	0,66	0,9	0,60	0,35	0,53	0,83	0,82	0,59
Кокаин	0,73	0,9	0,65	0,36	0,58	0,84	0,77	0,62
Спартеин	0,70	0,9	0,68	0,68	0,55	0,00	0,55	0,05

^а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.^б Длина пути элюирования 10 см.^в Дают удлинненные пятна.

Цветные реакции некоторых алкалоидов [9] ^а Таблица 15.2

Алкалоид	Окраска флуоресценции в УФ-свете (365 нм)	Окраска после опрыскивания иодоплатинатом	Число вторичных пятен
<i>Группа I</i>			
Нарцеин	—	Темно-синяя	—
Купреин	Желтовато-коричневая	Коричнево-красная	—
Сарпагин	—	Бежевая	—
Эргометрин	Фиолетово-синяя	Белая ^б	—
Морфин	—	Темно-синяя	—
Ди-изоэрготамин	Фиолетово-синяя	Коричневая	—
Серпентин	Темно-коричневая	Коричнево-красная	—
Эрготамин	Фиолетово-синяя	Розовая	—
Болдин	Фиолетовая	Бежевая	—
Дигидроморфинон	—	Коричнево-желтая	—
Эргометринин	Фиолетово-синяя	Фиолетово-синяя	—
Эфедрин	—	Светло-коричневая	—
Хинин	Синяя	Бледно-желтая	—
Дигидроэргокристин	Фиолетово-синяя	Коричневая	—
Горденин	—	Белая ^б	—
Эргокристин	Фиолетово-синяя	Бежевая—светло-коричневая	—
Хинидин	Синяя	Светло-желтая	1
Атропин	—	Фиолетово-синяя	—
Кольхицин	—	Светло-серая	—
Аймалин	Синеватая	Бежевая	2
Цинхонин	—	Коричнево-бежевая	—
Гоматропин	—	Фиолетово-синяя	—
Эрготаминин	Фиолетово-синяя	Розовая	—
Пилокарпин	—	Бледно-коричневая	—
Кодеин	—	Болотная	—
Дигидрокодеин	Синяя	Фиолетово-синяя	—
Серпентинин	Желто-зеленая	Желто-коричневая	—
Эргокристинин	Фиолетово-синяя	Светло-коричневая	—
Скополамин	—	Фиолетовая	—

Продолжение табл. 15.2

Алкалоид	Окраска флуоресценции в УФ-свете (365 нм)	Окраска после опрыскивания иодоплатинатом	Число вторичных пятен
Иохимбин	Сине-зеленая	Светло-желтая	3
Бруцин	—	Фиолетово-коричневая	1
Цефалин	Фиолетово-синяя	Белая ^б	3
Раувольцин	Желто-зеленая	Слабо-бежевая	1
Дигидрокодеинон	—	Фиолетовая	2
Апоатропин	—	Фиолетово-синяя	—
Стрихнин	—	Желтая	—
Резерпин	Зелено-желтая	Белая ^б	3
<i>Группа II</i>			
Физостигмин	—	Розовая	1
Аконитин	—	Красно-коричневая	3
Бульбокапнин	Синяя	Белая ^б	—
Эметин	—	Красно-коричневая	3
Папаверин	Желтоватая	Желтая	—
Котарнин	Зелено-желтая	Фиолетовая	1
Скополин	—	Белая ^б	—
Лобелин	—	Красно-коричневая	—
Наркотин	Синяя	Бледно-желтая	—
Тебаин	—	Красно-коричневая	—
Аспидоспермин	—	Белая ^б	—
Тропакокаин	—	Фиолетовая	—
Ареколин	—	Белая ^б	—
Гидрастинин	Стальная синяя	Фиолетово-синяя	1
Неопсикаин	—	Желтая	—
Кокаин	—	Фиолетовая	—
Спартеин	—	—	—

^а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.^б Розовый фон.

в том числе алкалоидов; в первой статье рассматриваются работы, опубликованные до 1972 г., во второй — работы, опубликованные в период с 1972 по 1974 г. Дополнительные ссылки можно найти в библиографиях общего порядка, упомянутых во введении к настоящему изданию.

Лучшим адсорбентом для разделения алкалоидов считается силикагель, хотя в этих целях использовались также оксид алюминия [17], целлюлоза [18], полиамид [19], кизельгур [20], тальк [21], оксид магния [22], карбонат кальция [23] и такие смешанные адсорбенты, как силикагель—оксид магния (1:1) [24] и карбонат кальция—оксид магния—гидроксид кальция (29,5:6:5) [25]. Иногда адсорбент смешивали со щелочью, чтобы получить щелочной слой.

Описано также разделение алкалоидов методом электрофореза [24—25] и двумерное разделение ТСХ в сочетании с электрофорезом [26]. Успешным оказалось также двумерное ТСХ [29, 30].

Разделение алкалоидов проводится с самыми разными растворителями; многочисленные примеры таких растворителей приведены при описании анализа соответствующих типов алкалоидов.

Для обнаружения чаще других используют хорошо известный реактив Драгендорфа или его модификации. Вагюифалви [31] применял разбавленный 1:4 раствор этого реактива. Этот же автор показал, что чувствительность обнаружения можно повысить, опрыскивая обработанную реактивом пластинку 10 %-ной серной кислотой. К числу обнаруживающих реактивов относятся также дансилхлорид, реактив Вагнера, раствор четырехазотированного бензидина [32], сульфат церия-аммония [23], реактив Мунье [34], ферроцианид калия [35], реактив Ван Урка [36], смесь хлорной кислоты с хлоридом железа (III) [37] и иодоплатинат [38], а также многие другие. Пойх и др. [39] применяли реактив Драгендорфа, после чего опрыскивали пластинки раствором нитрита натрия; чувствительность определения при этом составляла 0,1 мкг. Авторы работы [14] опрыскивали пластинки разбавленной серной кислотой, чувствительность определения некоторых опийных алкалоидов составляла при этом 0,01—0,05 мкг.

Разработан ряд методов количественного определения, проводимого как *in situ*, так и после элюирования. Это отражательное сканирование [40, 41], определение площади пятна [42], денситометрия [42, 43], флуоресценция [44], радиоактивное сканирование [45], титрование после элюирования [46], каталитическая полярография [47], спектрофотометрия после элюирования [48] и хроматографирование методом ГХ после элюирования [49].

2. ПУРИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Эти соединения можно разделять на кремневой кислоте, силикагеле [4,50—53], силикагеле, приготовленном на 0,2 М буферном растворе [54], и на оксиде алюминия [55]. Величины R_f для некоторых из этих соединений приведены в табл. 15.3. Балер [50] применял для обнаружения пятен и извлечения веществ метод микросублимации. Пятна можно обнаружить, опрыскивая пластинки последовательно следующими смесями: спиртовый раствор иода—раствор иодида калия и 25 %-ная соляная кислота — 96 %-ный этанол (1:1). Финке [56] использовал ТСХ для обнаружения кофеина и теобромона в масле какао.

Таблица 15.3

Величины $R_f \times 100$ некоторых пуриновых алкалоидов

Алкалоид	Силикагель, приготовленный с 0,2 М буферным раствором Серенсена, pH 6,8 [54]	Кремневая кислота ^a [50]		Незакрепленные слои оксида алюминия ^a [55]	
	хлороформ—96 %-ный этанол (9:1)	этилацетат—метанол—уксусная кислота (8:1:1)	этилацетат—метанол—HCl (18:2:0,05)	хлороформ— <i>n</i> -бутанол (98:2)	хлороформ—ацетон (1:1)
Теобромин	22	36	25	15	9
Теофиллин	37	50	41	30	15
Кофеин	57	41	36	55	60
Аминофиллин				30	15
Метилкофеин				55	60

^a В оригинальных статьях приведены величины R_f , полученные с другими элюентами.

При количественном определении кофеина, теобромона и теофилина пятна элюировали и измеряли поглощение элюата при 276 нм [53] или измеряли площади пятен [51].

3. ФЕНИЛАЛКИЛАМИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

К этой группе алкалоидов принадлежит широко применяемый в медицине эфедрин. Ристик и Томас [57] исследовали алкалоидные компоненты *Catha edulis*. Они проводили разделение на силикагелевых пластинках; элюентом служила смесь изопропанола с 5 %-ным гидроксидом аммония. Катин (*d*-псевдонорэфедрин) — основной алкалоид *Catha edulis*, ему сопутствует *l*-эфедрин и еще один, третий, алкалоид, содержание которого ничтожно. Значения R_f для трех алкалоидов оказались равными 0,62; 0,30 и 0,92 соответственно. Эфедрин не перемещается [9] в щелочных смесях растворителей, содержащих диэтиламин; в смеси ацетон—метанол—уксусная кислота (5:4:1) R_f равен 0,32. Авторы работы [58] разделяли алкалоиды этой группы смесью пропанол—5 %-ный аммиак (9:1) и бутанол—7,5 %-ный аммиак (9:1).

В *Lophorhiza williamsii* [59] обнаружен горденин; Тодд [60] нашел алкалоиды в кактусовых этого рода, растущих в различных районах Мексики. Лундстрем и Агурелл [61, 62] также занимались этой интересной группой соединений. Сато и др. [63] исследовали *Petecyphora aselliformis*. С этой точки зрения изучены также *Ariocarpus kotshoubeyanus* [64] и *A. fissuratus* [65]. Кочин и Дели [66] приводят значения R_f , полученные при исследовании мексиканской водки, для шести различных хроматографических систем. Тийяк и др. [67, 69] исследовали изомеры капсацина вида *Capsicum*.

4. ПИРИДИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Чеше и др. [70] выделили алкалоиды из *Lobelia siphilitica*; из большого числа находящихся там алкалоидов семь выделено в чистом виде методом распределительной и адсорбционной хроматографии. Распределительное хроматографирование проводили на бумаге, а адсорбционное на тонких слоях силикагеля, используя для разделения смесь хлороформ—этанол (3:1), а также на подкисленном оксиде алюминия, элюируя алкалоиды смесью хлороформ—метанол (19:1). Пять из семи алкалоидов идентифицированы и для них приведены значения R_f .

Ротер и др. [71] использовали ТСХ на силикагеле и оксиде алюминия при изучении синтеза и структурных особенностей анаферина.

Пайлер и Либизеллер [72, 73] также пользовались ТСХ для выделения, очистки и изучения структуры алкалоида эвонина из *Euonymus europaeus*.

Молл [74] проводил элюирование смесью хлороформ—абсолютный этанол—25 %-ный гидроксид аммония (9:1:1) при разделении алкалоидов болиголова крапчатого и других пиперидиновых оснований на силикагеле G в камере с насыщенной атмосферой. Обнаружение осуществляли обработкой пластинки парами пода или опрыскиванием вначале 0,5 %-ным раствором 1-хлор-2,4-динитробензола в этаноле, а затем 0,05 %-ным раствором бромтимолового синего в этаноле. Основания выявляются в виде синих пятен на желтом фоне.

5. ПИРРОЛИДИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Авторы работы [75] выделяли алкалоиды из проб *Achillea artemisia* на слоях силикагеля, элюируя пробу смесью хлороформ—метанол (1:2). Для обнаружения пятен применяли опрыскивание иодоплатинатом натрия или концентрированной серной кислотой с последующим нагреванием. Основной алкалоид этой группы—ахиленин; его трудно отделить от гликоколбетаина методом хроматографии на бумаге, однако на слоях силикагеля сделать это несложно. Среди обнаруженных таким способом компонентов был идентифицирован и *l*-стахидрин.

Видик [76] отделил синтетическое пирролидиновое соединение джетриум от морфина и других оснований на слоях силикагеля, проводя элюирование 0,1 н. раствором аммиака в метаноле (0,17 %-ный безводный аммиак). Величина R_f равна 0,85.

6. ПИРИДИН-ПИРРОЛИДИНОВЫЕ И ДИПИРИДИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Методика отделения никотина от других алкалоидов описана в ряде работ [66, 77, 78]. В табл. 15.4 приведены значения R_f для 11 различных систем элюентов. Обнаружение проводилось несколькими способами; так, в частности, никотин можно наблюдать в виде темного пятна на флуоресцирующей пластинке или в виде красно-фиолетового пятна при использовании реактива Драгендорфа. Фейер-Косси [79] опубликовал сообщение о разделении методом ТСХ 10 алкалоидов табака, причем последующее их обнаружение можно проводить спектрофотометрически [80]. Мартин [81] описал метод определения остатков никотина в пище.

Анабазин — алкалоид этой же группы — был определен с помощью трех различных смесей растворителей [78] на пластинках щелочного силикагеля. Значения R_f в смесях хлороформ—96 %-ный этанол состава 11:1; 9:1 и 8:2 оказались равными 0,14; 0,16 и 0,33 соответственно.

Алкалоиды *Nicotiana glauca* и *N. paniculata* были исследованы методами хроматографии на бумаге и ТСХ [82].

Таблица 15.4

Величины $R_f \times 100$ никотина в различных системах

Адсорбент	Система растворителей	$R_f \times 100$	Литература
Щелочной силикагель	Хлороформ—96 %-ный этанол (11 : 1)	38	78
Щелочной силикагель	Хлороформ—96 %-ный этанол (9 : 1)	44	78
Щелочной силикагель	Хлороформ—96 %-ный этанол (8 : 2)	62	78
Силикагель G	Метанол	50	4
Силикагель G	Метанол—ацетон—триэтанолламин (1 : 1 : 0,03)	56—58	76
Силикагель G	Этанол—пиридин—диоксан—вода (10 : 4 : 5 : 1)	58	77
Силикагель G	Этанол—уксусная кислота—вода (6 : 3 : 1)	27	77
Силикагель G	Этанол—диоксан—бензол—гидроксид аммония (1 : 8 : 10 : 1)	90	77
Силикагель G	Метанол— <i>n</i> -бутанол—бензол—вода (12 : 3 : 2 : 3)	44	77
Оксид алюминия G	<i>n</i> -Бутанол— <i>n</i> -бутиловый эфир—уксусная кислота (4 : 5 : 1)	72	77
Оксид алюминия G	<i>n</i> -Бутанол— <i>n</i> -бутиловый эфир—гидроксид аммония (5 : 14 : 1)	90	77

dl-Анабазин — основной компонент *N. glauca*, ему сопутствуют *l*-норникотин, никотин и пиперидин; в *N. paniculata* содержатся *l*-никотин (основной компонент) и в меньших количествах *l*-норникотин, пиридин и β -никотин.

7. МНОГОЯДЕРНЫЕ ПИПЕРИДИН-ПИРРОЛИДИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Для этой группы алкалоидов белладонны разработаны количественные методы определения атропина [83]. Атропин отделяют от других соединений на оксиде алюминия, элюируя метанолом; затем пятно атропина элюируют хлороформом. Растворитель удаляют при пониженном давлении и остаток переносят

в 2,0 мл спирта и 5 мл 0,01 н. серной кислоты. Избыток кислоты определяют обратным титрованием 0,01 н. раствором гидроксида натрия в присутствии индикатора — метилового красного. Можно также провести разделение пробы на компоненты на пластинке с силикагелем G и измерить площадь пятна атропина планиметром [84]. Этим методом при элюировании смесью метилэтилкетон—метанол—7,5 %-ный гидроксид аммония (3 : 1,5 : 0,5) были выделены следующие алкалоиды: апоскополамин, скополамин, озин, апоатропин, белладонин, атропин и тропин. Изомеры *l*-гиосциамин и атропин (*dl*-гиосциамин) выделить не удалось. Хана и др. [85] и Хафаджи и др. [86] разделяли алкалоиды *Withania* методом ТСХ на слоях силикагеля, используя смеси этанол—гидроксид аммония (8 : 2) и хлороформ—циклогексан—диэтиламин (7 : 3 : 1), Ферг и др. [87] отделили атропин от папаверина и аминопирина. Тейгелер [88] пишет об отделении атропина от апоатропина путем элюирования смесью хлороформ—абсолютный спирт—25 %-ный гидроксид аммония (9 : 1 : 1). Нейман и Шротер [89] на силикагеле G со смесью этанол—25 %-ный аммиак (8 : 2) получили следующие значения R_f : тропин 0,26; псевдотропин 0,44 и тропинон 0,75. Штайнеггер и Гебисторф [90] разработали простой экстракционный метод в сочетании с ТСХ и методом хроматографии на бумаге для быстрого определения вредных примесей в лекарствах из листьев дурмана, белладонны, гиосциана.

Ферцар-Петри и Хаггаг [91] исследовали алкалоиды *Datura innoxia* и выделили кускогигрин, гиосциамин, 3-тропоилтелондин, метелондин и скополамин (R_f 0,25; 0,30; 0,34; 0,50; 0,56 и 0,70 соответственно), применяя такие элюенты, как целлозольв—трет-амиловый спирт—вода—аммиак (6 : 12 : 6 : 0,2). Де Маггио и Лотт [92] обнаружили, что применение ультразвука при экстракции алкалоидов *Datura stramonium* увеличивает выход по сравнению с обычными методами.

Скополамин определяют количественно флуоресцентным методом [93], скополамин и гиосциамин [94] — прямым денситометрическим методом. Кокаин удалось отделить от атропина, гомоатропина и гиосциана [95], а также от кодеина, героина, 6-моноацетилморфина, морфина и хинина [96]. Разработаны методы обнаружения метаболитов кокаина в моче (см., например, работы [97—100]).

Полесук и Ма [101] изучили 23 системы растворителей, предназначенных для выделения и идентификации алкалоидов тропана и родственных соединений.

8. ХИНОЛИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Хинные алкалоиды

Восемь хинных алкалоидов разделены методом ТСХ на пластинках щелочного силикагеля [102]. Элюирование проводилось смесью хлороформ—метанол—диэтиламин (80:20:1); полученные значения R_f собраны в таблицу. Этим методом исследованы 14 выпускаемых в продажу препаратов [103]. Описан хроматографический анализ на прямых слоях силикагеля G [104] с элюированием смесью коресин—диэтиламин—ацетон (23:9:9). Освальд и Флюк [84] разделили небольшие количества (менее 1 мкг) хинина, цинхонина и хинидина, элюируя их смесью изопропанол—бензол—диэтиламин (2:4:1). Для четкого разделения больших количеств этих трех алкалоидов необходимо двукратное элюирование смесью бензол—эфир—диметиламин (20:12:5), причем каждый раз длина пути элюирования должна составлять 15 см. Хотя значения R_f хинидина и цинхонина весьма близки, тем не менее эти вещества можно различить: хинидин дает характерную флуоресценцию в длинноволновой УФ-области, а цинхонин образует при реакции с иодоплатинатом окрашенные в бежево-коричневый цвет продукты. Если пятна цинхонина перед обработкой иодоплатинатом опрыскать 98 %-ной муравьиной кислотой, они окрашиваются в темно-синий цвет. Определяя содержание хинина в коре хинного дерева, Брекман и др. [105] сочетали ТСХ и флуориметрический анализ. Некоторые значения R_f этих соединений приведены в табл. 15.1. Шаршунова и Гривняк [106] разделили хинные алкалоиды на силикагеле, элюируя их смесью хлороформ—ацетон—диметиламин (5:4:1), после чего провели количественный газохроматографический анализ выделенных соединений.

Сорок девять хинолиновых алкалоидов разделены на диоксиде кремния и оксиде алюминия при использовании следующих смесей элюентов: бензол—этилацетат (6:4), толуол—этилацетат—муравьиная кислота (5:4:1) и этилацетат—метанол (10:1) [107].

9. ИЗОХИНОЛИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Опийные алкалоиды

Алкалоиды этой группы имеют очень большое значение, и поэтому возможность их анализа методом ТСХ изучена довольно тщательно. Еще в 1953 г. Борке и Кирш [108] доказали применимость ТСХ для разделения опийных алкалоидов; исполь-

зованная этими авторами методика определения была впервые предложена Кирхнером и др. [1]. Разделение проводилось на слоях кремневой кислоты и оксида магния, взятых в соотношении 1:1, связующим служил алебастр. Борке и Кирш показали, как важно замешивать адсорбенты не на чистой воде, а на буферных растворах. В частности, для этой цели они использовали фосфатный буфер с pH около 6,6, а элюировали пробу диоксаном. Мариани и Мариани-Марелли [109] разделяли опийные алкалоиды на забуференном слое (pH 5, ацетатный буфер) оксида алюминия. Оксид алюминия активировали при 500 °C, после чего адсорбировали на нем 5 % буферного раствора. Экстракты различных опиумов можно разделить таким способом за 15 мин. Пятна наблюдают в УФ-свете. Нойбауэр и Мозес [110] для разделения 10 из наиболее важных опийных алкалоидов на слоях силикагеля G использовали смесь бензол—метанол (8:2). Для обнаружения пятен применяли реактив Драгендорфа, усовершенствованный Мунье. Описанным способом можно проводить и количественное определение: равномерно опрысканные пластинки фотографируют и затем промеряют пятна. Для разделения пяти групп опийных алкалоидов на слоях силикагеля Байер [111] использовал смесь ксилол—метилэтилкетон—метанол—диэтиламин (20:20:3:1). Таким образом ему удалось добиться хорошего разделения различных алкалоидов (табл. 15.5). Хойзер [112] определял методом ТСХ различные алкалоиды в лекарственных растениях, а также морфин в порошокобразном опиуме. В работах [113—115] описано разделение опийных алкалоидов методом двумерной хроматографии на оксиде алюминия. Количественное определение осуществлялось фотометрированием элюатов, а также путем промера пятна интегратором с устройством, регистрирующим экстинкцию. Моисеев [117] разделял опийные алкалоиды на силикагеле, элюируя их смесью бензол—этанол (9:1). При длине пути разделения 15 см получены следующие значения R_f : морфин 0,05; кодеин 0,11; тебаин 0,26 и папаверин 0,41. Купферберг и др. [118] использовали флуориметрический метод для идентификации субмикrogramмовых количеств морфина и родственных соединений; Сац и др. [119] обнаружили некоторые морфиновые алкалоиды, разделяя методом ТСХ различные соединения основного характера. Пенна-Геррерос [120] разделил на слоях силикагеля морфин, норморфин и налорфин. Для разделения морфина, хинина и папаверина Шанц [121] применил круговую хроматографию на силикагеле G. Икрам и др. [122] приводят значения R_f , полученные для морфина, кодеина, папаверина и наркотина на незакрепленных слоях оксида алюминия с тремя различными системами растворителей. Значения R_f для некоторых из наиболее важных морфиновых алкалоидов

Таблица 15.5

Величины $R_f \times 100$ некоторых опийных алкалоидов в различных системах

Алкалоид	Условия разделения *						
	A/a [108]	B/b [109]	B'v [110]	Г/г [129]	Д/д [129]	Е/е [129]	Ж/ж [111]
Морфин	39	50	11	3	14	28	12
Кодеин	62	45	21	16	64	85	26
Лауданин			26				
Лауданозин			42				
Папаверин	88	100	63	60	85	96	59
Тебаин			40	38	85	100	45
Наркотолин			58				
Наркотин	92		68	100	92	100	74
Нарцеин	0	20		0	0	0	
Криптоин			34				
Протопин			38				

* Элюенты: А — диоксан; В — этанол—*n*-бутанол—вода (1:9:1); В' — бензол—метанол (8:2); Г — *n*-гексан—ацетон (3:1); Д — хлороформ—этилацетат (3:1); Е — хлороформ—этилацетат (1:1); Ж — ксилит—метилэтилкетон—метанол—диэтиламин (20:20:3:1) Длина пути разделения 13,5 см

Адсорбенты а — кремневая кислота—плотный оксид магния (1:1) со связующим CaSO₄; б — оксид алюминия, забуференный до pH 5; в — силикагель G; г — плотный гидратированный оксид магния с 2,5% CaCl₂·6H₂O (5:9) (масса/объем); д — плотный гидратированный оксид магния с 2% MgSO₄·7H₂O (5:9) (масса/объем).

приведены в табл. 15.5, дополнительные значения R_f можно найти в табл. 15.1.

Тайхерт и др. [12,78] разделяли опийные алкалоиды и синтетические производные морфина на нейтральном и щелочном силикагеле, а также на слоях целлюлозы, пропитанных формамидом (табл. 15.6).

Мюле [13] описал разделение некоторых производных морфина на слоях целлюлозы, полученных смешением 15 г целлюлозы MN 300 G с 90 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 8,0), с применением двух растворителей и разделение на слоях силикагеля G с применением семи растворителей. В табл. 26.6 (т. 2) приведены величины R_f для этих соединений и для других наркотических анальгетиков. Шерма и др. [123] разработали

Таблица 15.6

Величины $R_f \times 100$ некоторых опийных алкалоидов и синтетических производных морфина [78]

Алкалоид	Условия разделения *			
	A a	B б	B б	Г/г
Морфин	10	2	27	0
Дилаудид	13	5	27	6
Дикодид	28	10	34	63
Кодеин	33	12	41	37
Дионин	37	14	44	57
Ацедикон	59	24	—	90
Эукодал	70	47	79	75
Папаверин	78	74	86	89
Наркотин	81	78	92	94
Тебаин	—	—	—	85

* Элюенты: А — хлороформ—этанол (8:2); Б — хлороформ—этанол (9:1); В — диметилформамид—диэтиламин—этанол—этилацетат (5:2:20:75), Г — бензол—гептан—хлороформ—диэтиламин (6:5:1:0,02).

Адсорбенты: а — силикагель G, приготовленный с 0,2 н. гидроксидом калия; б — силикагель G, в — слой целлюлозы, пропитанные 20 %-ным раствором формамида в ацетоне

спектроденситометрические определения производных морфина и амфетамина на тонких слоях. Городецкий [124] приводит данные по чувствительности обнаружения 16 опиоидов, кокаина и хинина. Стил [125] перечисляет восемь смесей растворителей для разделения и идентификации 26 наркотиков, найденных в описях; он обнаружил, что хорошее разделение морфина, кодеина, тебаина, папаверина и наркотина обеспечивают такие растворители, как этилацетат—бензол—ацетонитрил—аммиак (50:30:15:5 или 25:30:40:5). Разработана чувствительная методика определения морфина [126] и героина [127] в моче; Христопулос и Кириш [128] усовершенствовали методику выделения и идентификации морфина из тканей трупа.

Рагаци и др. [129] провели разделение ряда алкалоидов, включая некоторые соединения опийной группы (табл. 15.5), на слоях оксида магния, пропитанного фторидом кальция или сульфатом магния. В оригинальной статье приведены значения R_f для других алкалоидов, а также величины R_f , полученные

при элюировании опийных алкалоидов различными растворителями.

Хуанг и др. [130] разделили семь опийных алкалоидов на слоях полиамида, применяя смеси циклогексан—этилацетат—*n*-пропанол—диметиламин (30:2,5:0,9:0,1) и вода—абсолютный этанол—диметиламин (88:12:0,1).

Другие алкалоиды семейства маковых

Пфайфер [131, 132] проанализировал 82 алкалоида семейства маковых, проводя разделение на силикагеле G со смесью бензол—ацетон—метанол (7:2:1) и на оксиде алюминия со смесью гептан—хлороформ—эфир (4:5:1); полученные величины R_f он свел в таблицы, в которых дал также ссылки на оригинальные работы. Для дополнительного разделения алкалоидов с низкими значениями R_f Пфайфер рекомендует смесь бензол—ацетон—эфир—изопропанол—3 %-ный аммиак (20:15:10:7,5:2,5). Обнаружение пятен Пфайфер проводил модифицированным реактивом Драгендорфа [133].

Смешанные изохинолиновые алкалоиды

Проводя синтез изохинолиновых алкалоидов, Боббит и др. [134] осуществили разделение ацетатов алкалоидов методом препаративной ТСХ.

bis-Бензилизохинолиновые алкалоиды разделяли на слоях щелочного силикагеля G [135], элюируя их смесью растворителей хлороформ—этилацетат—метанол (2:2:1). В работе [135] приведены величины R_f , полученные при разделении шести соединений этой группы. Батнагар и Баттачари [136] также использовали ТСХ.

10. ИНДОЛОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Алкалоиды спорыньи

Склероции (рожки) спорыньи, содержащие большую группу алкалоидов, представляют собой грибницу гриба *Claviceps purpurea*. Клавен и Рохельмайер [137] и Клавен и др. [138] провели разделение алкалоидов спорыньи на нейтральном силикагеле со смесями хлороформ—этанол. Для обнаружения индоловых соединений пластинки опрыскивали реактивом Ван Урка. При полуколичественном определении обычно сравнивают интенсивность окраски пятен проб, обработанных реактивом Ван Урка, и стандартного соединения; при количественном определении элюируют определяемое соединение и после обработки

реактивом Ван Урка определяют интенсивность окраски элюата в колориметре. Тайхер и др. [54] разделяли эти же алкалоиды методом ступенчатого элюирования на целлюлозе, пропитанной формамидом. Целлюлозные пластинки пропитывали, окуная в 20 %-ный раствор формамида в ацетоне, после чего пластинки выдерживали, чтобы ацетон испарился. Сначала пробу элюировали смесью бензол—гептан—хлороформ (6:5:3), длина пути разделения при этом составляла 15 см, а затем в том же направлении смесью бензол—гептан (6:5) (табл. 15.7). В работе [139] описано разделение гидрированных алкалоидов спорыньи на пропитанном слое; в этом случае элюентом служила смесь этилацетат—гептан—диэтиламин (5:6:0,02). Райхель и Кудрнач [140] разделили 16 алкалоидов спорыньи на силикагеле, пропитанном формамидом, применяя смесь диизопропиловый эфир—тетрагидрофуран—толуол—диэтиламин (75:15:15:0,1) или изопропиловый эфир—толуол—этанол—диэтиламин (75:20:5:0,1).

Грогер и Эрдж [141] рассмотрели результаты разделений алкалоидов спорыньи, проведенных с восемью различными системами. Мак-Лафлин и др. [142] изучали разделение 12 алкалоидов спорыньи на силикагеле G со смесями бензол—диметилформамид (13:2) или этилацетат—диметилформамид—этанол (13:1,9:0,1) и на оксиде алюминия G со смесью хлороформ—этанол—вода (3:1:1) (табл. 15.7). Кроме опытов с индивидуальными соединениями были проведены анализы смесей и установлено влияние смеси на величины R_f индивидуальных компонентов. Обнаружение алкалоидов осуществляли, опрыскивая пластинки реактивом Эрлиха (5 %-ный раствор *n*-диметиламинобензальдегида в концентрированной соляной кислоте), и рассматривали их в УФ-свете. Количественное определение алкалоидов спорыньи проводят следующим образом: элюируют пятно, обрабатывая 30 мин раствор *n*-диметиламинобензальдегидом, и измеряют поглощение в области 590 нм. Поскольку алкалоиды данной группы изменяются под действием света, все эти операции проводят при слабом освещении. Авторы работы [143] определяли эти алкалоиды методом флуоресценции; чувствительность определения указанным способом колебалась в пределах 15—100 нг.

Грогер и др. [144] разделяли алкалоиды, полученные из *Claviceps paspali*, на закрепленных крахмалом слоях кремневой кислоты. Эти авторы сравнивают спорынью, доставленную из Австралии и собранную в США в шт. Арканзас. Проверять чистоту природных и гидрированных алкалоидов спорыньи, Цинсер и Баумгартель [145] проводили разделение на пластинках силикагеля со смесями бензол—хлороформ—этанол (2:4:1) и гептан—четырёххлористый углерод—пиридин (1:3:2).

Таблица 15.7

Величины $R_f \times 100$ алкалоидов спорыньи и некоторых гидрированных производных *

Алкалоид	Силикагель G					Целлюлоза, пропитанная ДМФ	
	а	б	в	г	д	е	ж
Эрготамин	1,0	31,3	30,8	13	51	6	11
Эргозин	1,6	35,0	31,4	13	51	11	17
Эргокрестин	9,3	54,4	55,8	28	69	67	41
Эргокорнин	9,5	57,9	58,8	28	69	73	50
Эргокриптин	14,8	59,8	55,4	28	69	83	61
Эрготаминин	6,5	68,2	63,8	34	75	50	
Эргозинин	11,5	74,7	67,7	34	75	65	
Эргокрестинин	37,9	79,6	74,3	45	81	90	
Эргокорнинин	31,0	83,3	72,6	45	81	93	
Эргокриптинин	45,7	85,4	74,6	45	81	97	
Эргоновин	0,0	17,3	12,0				
Эргометринин	0,8	44,1	38,4		30		
Эргометрин					17		
Дигидроэрготамин					11		9
Дигидроэргокрестин					14		30
Дигидроэргокорнин							38
Дигидроэргокриптин							50

* Элюенты: а — хлороформ—этанол—вода (3:1:1), длина пути разделения 17 см [142]; б — этилацетат—N,N-диметилформамид—этанол (13:1,9:0,1), 17 см [142]; в — бензол—N,N-диметилформамид (13:2), 17 см [142]; г — хлороформ—этанол (19:1), 10 см [137, 138]; д — хлороформ—этанол (9:1), 10 см [137, 138]; е — первое разделение бензол—гептан—хлороформ (6:5:3), 15 см, и второе разделение бензол—гептан (6:5), 15 см [54]; ж — этилацетат—гептан—диэтиламин (5:6:0,02) [139]

С помощью этой же методики проверяли устойчивость алкалоидов спорыньи в водных препаратах.

Как показали Клавен и Рохельмайер [137] (табл. 15.8), алкалоиды, родственные клавину, можно разделить на силикагеле. В качестве элюентов пригодны хлороформ—этанол и этилацетат—этанол—диметилформамид (85:10:5). Лучшее разделение

получают в том случае, когда вначале элюируют пробу смесью хлороформ—этанол (95:5), а затем диметилформамидом. Агу-релл и Рамстад [146] выделяли алкалоиды клавина из спорыньи *Pennisetum* на силикагеле G, элюируя пробу смесью этилацетат—этанол—диметилформамид (13:1:1). Эти авторы определили значения R_f для 18 соединений (табл. 15.8).

Таблица 15.8

Величины $R_f \times 100$ клавинных алкалоидов, полученные на силикагеле с различными элюентами

Алкалоид	Этилацетат—этанол—диметилформамид (13:1:1) [146]	Хлороформ—этанол [137] ^а		
		95:5	90:10	80:20
Аргоклавин	54	15	38	45
Элимоклавин	23	2	13	15
Пенниклавин	38	4	17	20
Изопенниклавин	71	8	30	35
Сетоклавин	68	18	42	50
Изосетоклавин	81	20	46	60
Секаклавин	5			
Лизерген	75			
Лизергол	27			
Изолизергол	57			
Фестуклавин	36			
Пироклавин	51		20	
Лизергин	64			
Изолизергин	78			
Костаклавин	16			
Дигидроэлимоклавин	12			
Фумигаκлавин А	74			
Фумигаκлавин В	40			

^а Длина пути разделения 10 см.

Хофман [147] и Хофман и Чертер [148] исследовали семена *Rivea corymbosa*, о лекарственных свойствах которого известно с давних времен, и *Ipomoea tricolor Cav.* Разделение проб на

компоненты проводилось на слоях оксида алюминия с использованием смеси хлороформ—метанол (95:5). Для успешной идентификации оказалось необходимым комбинировать колоночную хроматографию с препаративной ТСХ. В результате были выделены кристаллические соединения, идентифицированные как амид лизергиновой кислоты, амид изолизергиновой кислоты, ханоклавин, элимоклавин и лизергол. Байерман и др. [149] исследовали семена, а в некоторых случаях и листья 25 видов семейства вьюнковых на присутствие индоловых алкалоидов и алкалоидов спорыньи. Эти алкалоиды были обнаружены только в *Ipomea rubrocoerulea* Hook var. *Praecox* и в одном из сортов *Ipomea* были найдены индоловые алкалоиды.

Полученные хроматограммы практически идентичны хроматограммам, приведенным Хофманом [147].

Генест и Фармило [150] использовали метод ТСХ для обнаружения и определения диэтиламида лизергиновой кислоты в присутствии героина или других официально проверяемых лекарственных веществ. После элюирования пятен проводили спектрофлуориметрический анализ. Изучая возможность идентификации лизергиновой кислоты среди 14 родственных алкалоидов спорыньи, включенных в список запрещенных лекарственных веществ, Фаулер и др. [151] обнаружили, что ни один индивидуальный растворитель из 18 исследованных не может обеспечить отделение лизергидов от других алкалоидов.

Алкалоиды видов *Rauwolfia*

Эти алкалоиды разделяли на незакрепленных слоях оксида алюминия [122] и на слоях целлюлозы, пропитанных формамидом [78] (табл. 15 9). Дополнительные данные по значениям R_f можно найти в табл. 15.2.

Шлеммер и Линк [152, 153] выделили резерпин, элюируя пробу, помещенную на пластинку с силикагелем, смесью метилэтилкетон—гептан (8,4:33,6:58). Количественное определение было осуществлено следующим образом: пятна элюировали смесью 96 %-ный этанол—диоксан (1:1) и измеряли на спектрофотометре поглощение элюата в УФ-свете. Лиукконен [154] использовал этот же метод для разделения резерпина, ресцинамина, аймалина, иохимбина и раубазина.

Ульман и Кассалитцкий [155] выделили резерпин и ресцинамин из фармацевтических растворов, содержащих в качестве добавки полиэтиленоксид. Предварительное разделение проводили следующим образом: смешивали 4 мл жидкого экстракта с 3,0 г 10 %-ного раствора карбоната натрия и растирали затем с 4 г кизельгура. После тщательной сушки смеси в эксикаторе ее затем экстрагировали хлороформом. Экстракт концентриро-

Таблица 15 9

Величины $R_f \times 100$ некоторых алкалоидов видов *Rauwolfia*

Алкалоид	Пропитанный формамидом целлюлоза и гептан—метилэтилкетон (1:1) [78] ^а	Незакрепленные слои оксида алюминия		
		хлороформ—ацетон (85:15) ^б	абсолютный этанол ^б	хлороформ—этанол—ацетон (90:5:5) ^б
Сарпагин	3,0			
Серпентин	6,0	2,4	75	34
Аймалин	28	2,4	87	51
Иохимбин	33			
Ресциннамин	51			89
Резерпин	59	60		
Резерпинин	89			
Аймалицин		77		
Серпентинин			86	73

^а Разделение проводили в атмосфере аммиака

^б Длина пути разделения 13 см

вали при низкой температуре до объема 5 мл и наносили на слои силикагеля, пропитанные формамидом. Для разделения применяли смесь *n*-гептан—металэтилкетон (2:1), насыщенную водой. Для обнаружения пятен использовался реактив Драгендорфа; чувствительность определения при этом составляла 0,5 мкг. Опрыскивая пластинки после реактива Драгендорфа смесью 100 мл 5 %-ной хлорной кислоты и 3 мл 0,05 М раствора хлорида железа (III), можно повысить чувствительность определения до 0,05 мкг. Количественное определение осуществляют по способу Шлеммера и Линка [152, 153]. Курт [156] разделил алкалоиды видов *Rauwolfia* на две группы, эстрагируя раствор алкалоидов в 1 М соляной кислоте хлороформом при двух различных концентрациях аммиака. Более слабые основания удалось разделить на силикагеле, применяя смесь метанол—метилэтилкетон—гептан (1:3:6); более сильные основания делили, элюируя смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1). Для количественного определения 12 обычных алкалоидов вида *Rauwolfia* применяли пять систем растворителей.

Алкалоиды хармалы

Бернауэр [158] выделил хармин и 1,2,3,4-тетрагидрохармин из индийских слабых наркотиков экстракцией с последующим хроматографированием на оксиде алюминия при элюировании смесью ацетон—этанол (85:15). Применяя тонкие препаративные слои, хармин можно извлечь с выходом 1,3%, а его тетрагидропроизводное — с выходом 0,2%. Грогер [159] выделил харман, хармин, хармалин, хармол и хармалол на силикагеле, пользуясь такими смесями растворителей, как хлороформ—метанол—10%-ный аммиак (80:20:1,5) и хлороформ—метанол (3:1); при этом были получены следующие значения R_f : 0,65; 0,5; 0,66; 0,44; 0,35; 0,02; 0,46; 0,30; 0,13 и 0,02 соответственно. Лутомский и др. [160] определяли харман и хармин спектроскопическими методами после обработки элюатов смесью метанол—серная кислота (100:1).

Стрихниновые алкалоиды

В работе [161] описана методика отделения стрихнина от бруцина на силикагеле G. На пятно пробы наносят раствор бихромата калия, окисляя тем самым бруцин до *o*-хинона, который остается на линии старта. Стрихнин же элюируют и затем обрабатывают реактивом Бурхарда, при этом он дает коричневые пятна. Этим методом обнаруживают стрихнин и бруцин во внутренних органах отравленных крыс.

Грандолини и др. [162] разделяли стрихниновые алкалоиды на силикагеле, применяя смесь бутанол—соляная кислота (95:5), насыщенную водой, а также смесь хлороформ—метанол (4:1). Описана также методика двумерного элюирования смесями на основе хлороформа в одном направлении и кислотным элюентом в другом. Этим же авторам удалось выделить из *Skyganthus acutus* некоторые стереоизомерные алкалоиды, относящиеся к группе циклопентанолпиперидиновых. Для различных исследованных алкалоидов приведены значения R_f . Вайсман и др. [163] провели выделение некоторых продуктов реакции стриханона методом ТСХ на больших пластинках.

Тридцать алкалоидов, найденных в растениях вида *Strychnos*, удалось разделить методом ТСХ на оксиде алюминия с семью различными системами растворителей; исследована корреляция между значением R_f и строением соединения [164].

Алкалоиды видов барвинка (алкалоиды *Cantharanthus*)

Яковлевич и др. [165] выделили из *Vinca rosa* восемь алкалоидов. Разделение эти авторы проводили на слоях оксида алюминия, к которому, чтобы избежать образования «хвостов» у пятен, добавляли 0,5 н. раствор гидроксида лития. В качестве элюентов они использовали смеси этанол—ацетонитрил (5:95) и бензол—ацетонитрил (7:3). Для обнаружения применяли 1%-ный раствор сульфата церия-аммония в 85%-ной фосфорной кислоте. Под действием этого реактива пятна различных алкалоидов окрашиваются в разные цвета. Пластинки опрыскивают разбавленным вдвое реактивом и нагревают 5 мин при 100°C. Обнаружение пятен следует проводить сразу же после разделения, так как при интервале более чем в 30 мин пятна окрашиваются слабо. При разделении на оксиде алюминия [166] использовали такие элюенты, как бензол, бензол—этиловый эфир (1:1) и бензол—этилацетат (4:1). Кон и др. [167] приводят значения R_f для 26 алкалоидов видов барвинка *Vinca L.*, полученные на силикагеле и оксиде алюминия с применением 9 элюентов. Для некоторых более трудных разделений рекомендуются два дополнительных растворителя. Сложные смеси с успехом анализируются методом двумерного хроматографирования. Фарнсворс и др. [168] исследовали разделение 63 алкалоидов *Cantharanthus* на силикагеле с тремя элюентами.

Оксиндоловые алкалоиды

Шеллард и др. [169] провели хроматографический анализ 18 оксиндоловых алкалоидов на силикагеле и оксиде алюминия и опубликовали ряд статей, посвященных этой группе алкалоидов. В частности, эти авторы рассмотрели способы количественного определения оксиндолов *Mitragyna* методами денситометрии [170], УФ-спектрофотометрии [171] и колориметрии [172]. На силикагеле элюирование велось смесями: хлороформ—ацетон (5:4), этилацетат—хлороформ (95:5), этилацетат—17%-ный аммиак—изопропанол (9:4:7), а также эфир—диэтиламин (19:1). На пластинках со слоями оксида алюминия пробу можно элюировать смесью этилацетат—хлороформ (95:5). Недавно Шеллард и Хоутон [173] исследовали виды *Mitragyna*, растущие в Азии.

Различные индоловые алкалоиды

Кумп и сотр. [174—176] проводили работы по выделению алкалоидов *Pleiocarpa* на силикагеле G, применяя для элюирования 7%-ный раствор метанола в хлороформе. Ими получены

следующие значения R_{st} (если в качестве стандарта принят плейокарпин): плейокарпинин 0,69; копсинин 0,62; эбурнамнин 0,90; плейомутин 0,37; плейомутинин 0,17; плейокарпамин 0,48 и плейокарпинидин 0,46. При элюировании 4 %-ным раствором метанола в хлороформе плейокарпинилам даст $R_{st}=1,55$, а копсинилам—1,35. В качестве реактива для обнаружения Кумп и сотрудники использовали насыщенный раствор сульфата церия в 60 %-ной серной кислоте.

Вальсер и Джерасси [177] исследовали алкалоиды *Vallesia dichotoma* и привели значения R_f 22 индоловых и дигидроиндоловых алкалоидов, полученных при разделении этих соединений на силикагеле с помощью смесей растворителей метанол—метиленхлорид (5:95) и метанол—этилацетат (5:95). В работе этих авторов [178] указывается также, в какие цвета окрашиваются пятна при опрыскивании пластинок реактивом Т-53 (сульфат церия).

Аугрелл и др. [179] исследовали индоловые алкалоиды видов *Virola* и других южноамериканских растений. Из *Riccardia sinuata* выделены два новых соединения [180]. Авторы работы [181] разработали методику выделения из биологических материалов и идентификации индолового алкалоида ибобаина. Филлипсону и Шелларду [182] удалось методом ТСХ на оксиде алюминия с добавкой 15 % сульфата кальция разделить индоловые алкалоиды с *цис*- и *транс*-кольцевыми связями.

11. ПИРРОЛИЗИДИНОВЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Чалмерс и др. [183] приводят величины R_f для группы из 58 соединений, включая пирролизидиновые алкалоиды и основные их производные, полученные на слоях силикагеля G, приготовленных из 30 г смеси адсорбент—связующее с 60 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. В качестве элюента использовался метанол. Кроме того, эти же авторы приводят величины R_f , полученные методом хроматографии на бумаге, и времена удерживания, установленные при газохроматографическом анализе. Шарма и др. [184] исследовали восемь видов *Crotalaria*. Пирролизидиновые основания разделяли на силикагеле, применяя для элюирования смесь хлороформ—метанол—аммиак (85:14:1). Алкалоиды *Liguaria* и *Senecia* изучали методом ТСХ [183, 186]. Маттокс [187] предложил более чувствительную пробу на пирролизидиновые алкалоиды, которая является положительной только в случае алкалоидов с ненасыщенным (3-пирролин) кольцом в основной части (Т-244).

12. РАЗЛИЧНЫЕ АЛКАЛОИДЫ

Шарлеман [188] выделил алкалоиды акридина из наростов *Ruta graveolens*, применив смешанные слои адсорбентов из карбоната кальция—оксида магния—гидроксида кальция (29,5:6:5) и такой элюент, как петролейный эфир—бензол—метанол—метилэтилкетон (70:20:2:8), и полиамид со смесью тех же растворителей, взятых несколько в другом соотношении (50:40:5:5).

Германек и др. [189] привели список значений R_f для 37 алкалоидов, разделенных на слоях оксида алюминия с использованием 8 различных растворителей, включая хлороформ, этанол, бензол и смеси этанола и хлороформа. Парис и Парис [190] приводят величины R_f , полученные для 20 алкалоидов на силикагеле и оксиде алюминия. В статье [122] дан список величин R_f для 42 алкалоидов *Amarillidaceae*; эти алкалоиды были разделены на силикагеле G с применением этилацетата, хлороформа и метанола (2:2:1).

Мате и др. [191] исследовали алкалоиды *Colchicum hungaricum*. Элюентами служили хлороформ, метанол и смесь этилацетат—бензол (5:95); тонкий слой готовили из силикагеля. Проведенные исследования показали, что в *Colchicum hungaricum* и *Colchicum autumnale* содержатся в основном одни и те же алкалоиды. Авторы [192] разделили на силикагеле G производные некоторых колхициновых алкалоидов подсемейства *Wurmbaeoideae*, применяя элюирование смесями бензол—этилацетат—диэтиламин (5:4:1 и 7:2:1) и циклогексан—диэтиламин (4:1) и 8 %-ным метанолом. Для отделения колхициновых алкалоидов от геленовых препаратов колхицина использовалась двумерная ТСХ [193].

Алкалоиды *Senecio cineraria* разделяли [194] на силикагеле со смесью хлороформ—метанол (9:1). Анализ алкалоидов *S. vulgaris* проведен методом двумерной ТСХ на силикагеле со смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (1:1:1) в одном направлении и метанол—во втором [195].

Фиш и Уотерман [196] обнаружили шесть алкалоидов в *Fagaria macrophylla*, проанализировав хроматографически на слоях силикагеля фракцию, растворимую в хлороформе. Эти же авторы [197] изучили алкалоиды *Fagaria rubescens* и *F. lepreurii*.

Алкалоиды корней ипекакуаны также были разделены методом ТСХ на слоях силикагеля G при элюировании пробой смесью толуол—бензол—этилацетат—диэтиламин—метанол (35:35:20:10:2) [198]. Авторы статьи [199] разработали денситометрический метод определения основных алкалоидов.

Хабиб и Харкисс [198] также опубликовали работу по количественному определению эметина и сефаелина.

Хо и Мартин [200] выделили на диоксиде кремния из смеси хинолизидиновых алкалоидов 22 алкалоида люпина. Элюентом в данном исследовании служила смесь хлороформ—метанол—аммиак с соотношением компонентов от 95:4:1 до 85:15:1. В этой же работе приведены величины R_f , полученные при разделении на оксиде алюминия (бензол—ацетон—метанол, 34:3:3) и целлюлозе (бутанол—конц. соляная кислота—вода, 70:7,5:13,5).

Лепри и др. [201] проанализировали 48 алкалоидов методом ТСХ на тонких слоях катионо- и анионообменников. В работе этих авторов приведены величины R_f , полученные для 41 алкалоида на ионообменниках био-ред AG 1-X4 и целлекс D с четырьмя буферными растворами при различных pH, а также на слое микрокристаллической целлюлозы с одним буферным раствором. Обнаружение пятен осуществлялось усовершенствованным реактивом Драгендорфа.

ЛИТЕРАТУРА

- Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
- Kozuka H., Kagaku Kenkyusho Hokoku, 16, 39 (1963); through Chem. Abstr., 59, 15121 (1963).
- Лобанов В. И., Судебно-медицинская экспертиза, 6, 42 (1963).
- Machata G., Mikrochim. Acta, 47, 79 (1960).
- Farnsworth N. R., Euler K. L., Lloydia, 25, 186 (1962).
- Munier R., Macheboeuf M., Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 846 (1951).
- Neto J. J., Mancini B., Rev. Fac. Farm. Odontol. Araraquara, 2, 29 (1968); through Chem. Abstr., 71, 16016m (1969).
- Bush L. P., Jeffreys J. A. D., J. Chromatogr., 111, 165 (1975).
- Waldi D., Schnackerz K., Munter F., J. Chromatogr., 6, 61 (1961).
- Baiulescu G. E., Constantinescu T., Anal. Chem., 47, 2156 (1975).
- Noirfalise A., Mees G., J. Chromatogr., 31, 594 (1967).
- Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Z. Anal. Chem., 181, 325 (1961).
- Mule S. J., Anal. Chem., 36, 1907 (1964).
- Tyihak E., Held G., "Thin-Layer Chromatography in Pharmacognosy", in Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. II, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1971, p. 183.
- 14a. Tyihak E., Vágújfalvi D., "Thin-Layer Chromatography and Related Methods", Vol. III, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1972, p. 71.
- Anonymous, J., Chromatogr., Sci., 12, 328 (1974).
- Anonymous, J., Chromatogr., Sci., 10, 352 (1972).
- Achari R. G., Court W. E., Planta Med., 24, 176 (1973).
- Giacoello D., J. Chromatogr., 19, 172 (1965).
- Hsiu H.-C., Huang J.-T., Shih T.-B., Yang K.-L., Wang K.-T., Lin A. L., J. Chin. Chem. Soc. (Taiwan), 14, 161 (1967).
- Ivanov N., Boneva A., Bulg. Tyutyun, 11, 30 (1966); through Chem. Abstr., 65, 8668f (1966).
- Zarebska I., Ozarowski A., Farm. Pol., 22, 518 (1966); through Chem. Abstr., 66, 40741m (1967).
- Ragazzi E., Veronese G., Mikrochim. Acta, 1965, 966.
- Ebel S., Bahr E., Plate E., J. Chromatogr., 59, 212 (1971).
- Borke M. L., Kirch E. R., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 42, 627 (1953).
- Scharlemann W., Z. Naturforsch., 27b, 806 (1972).
- Agurell S., Acta Pharm. Succica, 2, 357 (1965); through Chem. Abstr., 64, 6404g (1966).
- Calderwood J. M., Fish F., J. Pharm. Pharmacol., 21 (Suppl.), 126 (1969).
- Wan A. S. C., J. Chromatogr., 60, 371 (1971).
- Seiler N., Demisch L., Biochem. Pharmacol., 23, 259 (1974).
- Haag-Berrurier M., Mathis M. C., Ann. Pharm. Fr., 31, 457 (1973).
- Vágújfalvi D., Planta Med., 13, 79 (1965).
- Hornemann K. M. K., Neal J. M., McLaughlin J. L., J. Pharm. Sci., 61, 41 (1972).
- Aynilian G., Farnsworth N. R., Lyon R. L., Fong H. H. S., J. Pharm. Sci., 61, 298 (1972).
- Castagnou M. R., Larcebau S., Bull. Soc. Pharm. Bord., 103, 201 (1964); through Chem. Abstr., 62, 10798f (1965).
- Guven K. C., Guven N., Eczacilik Bull., 14, 75 (1972); through Anal. Abstr., 24, 3040 (1973).
- Niwaguchi T., Inoue T., J. Chromatogr., 43, 510 (1969).
- Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Dtsch. Apoth.-Ztg., 100, 477 (1960).
- Haisová K., Slavik J., Dolejs L., Collect. Czech. Chem. Commun., 38, 3312 (1973).
- Puech A., Jacob M., Gaudy D., J. Chromatogr., 68, 161 (1972).
- Shellard E. J., Sarpong K., J. Pharm. Pharmacol., 22, (Suppl.), 34S (1970).
- Smith G., Proc. Soc. Anal. Chem., 8, 66 (1971).
- Костенникова З. Р., Хухуро В. Е., Фармазия, М., 18, 39 (1969).
- Shellard E. J., Houghton P. J., Planta Med., 20, 82 (1971).
- Messerschmidt W., J. Chromatogr., 33, 551 (1968).
- Wakelyn P. J., Stipanovic R. D., Bell A. A., J. Agric. Food Chem., 22, 567 (1974).
- Karatodorov K., Farmatsiya (Sofia), 16, 41 (1966); through Chem. Abstr., 66, 68970j (1967).
- Chen C.-C., Chang S.-L., Tai J.-L., Yao Hsueh Hsueh Pao, 13, 131 (1966); through Chem. Abstr., 65, 8674c (1966).
- Saint-Firmin A. R., Paris R. R., J. Chromatogr., 31, 252 (1967).
- Saršunová M., Hrivnák J., Pharmazia, 29, 608 (1974).
- Baehler B., Helv. Chim. Acta, 45, 309 (1962).
- Senanayake U. M., Wijesekera R. O. B., J. Chromatogr., 32, 75 (1968).
- Luedy-Tenger F., Pharm. Acta Helv., 45, 254 (1970).
- Franzke C., Grunert K. S., Griehl H., Z. Lebensm.-Unters.-Forsch., 139, 85 (1969).
- Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Dtsch. Apoth.-Ztg. 100, 283 (1960).
- Saršunová M., Schwarz V., Pharmazia, 18, 207 (1963).
- Fincke A., Fette, Seifen, Anstrichm., 65, 647 (1963).
- Ristic S., Thomas A., Arch. Pharm., 295, 524 (1962).
- Ruecher G., Kroger H., Schikarski M., Quedan S., Planta Med., 24, 61 (1973).
- McLaughlin J. L., Paul A. G., J. Pharm. Sci., 54, 661 (1965).
- Todd J. S., Lloydia, 32, 395 (1969).
- Lundstroem J., Agurell S., J. Chromatogr., 30, 271 (1967).

62. Agurell S., *Lloydia*, **32**, 206 (1969).
63. Neal J. M., Sato P. T., Howald W. N., McLaughlin J. L., *Science*, **176**, 1131 (1972).
64. Neal J. M., Sato P. T., Johnson C. L., McLaughlin J. L., *J. Pharm. Sci.*, **60**, 477 (1971).
65. Norquist D. G., McLaughlin J. L., *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1840 (1970).
66. Cochlin J., Daly J. W., *Experientia*, **18**, 294 (1962).
67. Tyihák E., Gulyás A., Juhász K., *Herba Hung.*, **5**, 225 (1966); through *Chem. Abstr.*, **68**, 4312r (1968).
68. Tyihák E., Juhász K., Gulyás A., Szoeko J., *Abh. Dtsch. Akad. Wiss., Berlin Kl. Chem. Geol. Biol.*, **1966**, 623.
69. Juhász K., Tyihák E., *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.*, **18**, 113 (1969).
70. Tschesche R., Kométani K., Kowitz F., Snatzke G., *Chem. Ber.*, **94**, 3327 (1961).
71. Rother A., Bobbitt J. M., Schwarting A. E., *Chem. Ind. (London)*, **1962**, 654.
72. Pailer M., Libiseller R., *Monatsch. Chem.*, **93**, 403 (1962).
73. Pailer M., Libiseller R., *Monatsch. Chem.*, **93**, 511 (1962).
74. Moll F., *Arch. Pharm.*, **296/68**, 205 (1963).
75. Pailer M., Kump W. G., *Arch. Pharm.*, **293/65**, 646 (1960).
76. Vidic E., *Arch. Toxikol.*, **19**, 254 (1961).
77. Baeumler J., Rippstein S., *Pharm. Acta Helv.*, **36**, 382 (1961).
78. Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **100**, 477 (1960).
79. Fejér-Kossey O., *J. Chromatogr.*, **31**, 592 (1967).
80. Lovkova M. Y., Minozhed N. S., *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, **5**, 487 (1969); through *Chem. Abstr.*, **71**, 105239d (1969).
81. Martin R. J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 766 (1966).
82. González A. G., Diaz Rodriguez F., *An. Real Soc. Espan. Fis. Guim. (Madrid)*, Ser. B, **58**, 431 (1962); through *Chem. Abstr.*, **58**, 3686 (1963).
83. Ikram M., Bakhsh M. K., *Anla. Chem.*, **36**, 111 (1964).
84. Oswald N., Flueck H., *Pharm. Acta Helv.*, **39**, 293 (1964).
85. Khanna K. L., Schwarting A. E., Rother A., Bobbitt J. M., *Lloydia*, **24**, 179 (1961).
86. Khafagy S., El-Moghazy A. M., Sandberg F., *Svensk Farm. Tidskr.*, **66**, 481 (1962).
87. Vegh A., Budvari R., Szasz G., Brantner A., Gracza P., *Acta Pharm. Hung.*, **33**, 67 (1963).
88. Teijgeler C. A., *Pharm. Weekblad*, **97**, 507 (1962).
89. Neumann D., Schroeter H.-B., *J. Chromatogr.*, **16**, 414 (1964).
90. Steinegger E., Gebistorf J., *Pharm. Acta Helv.*, **37**, 343 (1962).
91. Verzár-Petri G., Haggag M. Y., *Herba Hung.*, **15**, 87 (1976).
92. DeMaggio A. E., Lott J. A., *J. Pharm. Sci.*, **53**, 945 (1964); through *Chem. Abstr.*, **61**, 11847e.
93. Messerschmidt W., *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **109**, 199 (1969); through *Anal. Abstr.*, **18**, 4295 (1970).
94. Chu B. L. W., Mika E. S., Solomon M. J., Crane F. A., *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1073 (1969).
95. Fiebig A., Felczak J., Janicki S., *Pharm. Pol.*, **25**, 971 (1969).
96. Paul J., Conine F., *Microchem. J.*, **18**, 142 (1973).
97. Koontz S., Besemer D., Mackey N., Phillips R., *J. Chromatogr.*, **85**, 75 (1973).
98. Bastos M. L., Hoffman D. B., *J. Chromatogr., Sci.*, **12**, 269 (1974).
99. Bastos M. L., Jukojsky D., Mulé S. J., *J. Chromatogr.*, **89**, 335 (1974).
100. Wallace J. E., Hamilton H. E., Schwertner H., King D. E., McNay J. L., Blum K., *J. Chromatogr.*, **114**, 433 (1975).
101. Polesuk J., Ma T. S., *Mikrochim. Acta*, **1970**, 670.

102. Suszko-Purzycka A., Trzebny W., *J. Chromatogr.*, **16**, 239 (1964).
103. Suszko-Purzycka A., Trzebny W., *J. Chromatogr.*, **17**, 114 (1965).
104. Mueller K. H., Honerlagen H., *Arch. Pharm.*, **293/65**, 202 (1960).
105. Braeckman P., van Severen R., De Jaeger-Van Moeske L., *Pharm. Tijdschr. Belg.*, **40**, 113 (1963); through *Chem. Abstr.*, **60**, 1541 (1964).
106. Saršunová M., Hrivnak J., *Pharmazie*, **29**, 608 (1974).
107. Rózsa Z., Szendrei K., Novák I., Minker E., Koltai M., Reisch J., *J. Chromatogr.*, **100**, 218 (1974).
108. Borke M. L., Kirch E. R., *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **42**, 627 (1953).
109. Mariani A., Mariani-Marelli O., *Rend. Ist Super. Sanita*, **22**, 759 (1959); *Chem. Abstr.*, **54**, 11374 (1960).
110. Neubauer D., Mothes K., *Planta Med.*, **9**, 466 (1961).
111. Bayer I., *J. Chromatogr.*, **16**, 237 (1964).
112. Heusser D., *Planta Med.*, **12**, 237 (1964).
113. Poethke K., Kinze W., *Arch. Pharm.*, **297/69**, 593 (1964).
114. Poethke W., Kinze W., *Pharm. Zentralhalle*, **101**, 685 (1962).
115. Poethke W., Kinze W., *Pharm. Zentralhalle*, **102**, 692 (1963).
116. Poethke W., Kinze W., *Pharm. Zentralhalle*, **103**, 577 (1964).
117. Mouceev P. K., *Аптечное дело*, **13**, 29 (1964).
118. Kupferberg H. J., Burkhalter A., Way E. L., *J. Chromatogr.*, **16**, 558 (1964).
119. Szasz G., Khin L., Budvari R., *Acta Pharm. Hung.*, **33**, 245 (1963).
120. Penna-Herreros A., *J. Chromatogr.*, **14**, 536 (1964).
121. Von Schantz M., "Über die Anwendung der Zirkulartechnik Beim Chromatographieren auf Kieselgel-Dünnschichten, Trennung und Reindarstellung von Morphin, Papaverin und Chinin aus Deren Gemischen", in *Thin-Layer Chromatography*, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 122.
122. Ikram M., Miana G. A., Islam M., *J. Chromatogr.*, **11**, 260 (1963).
123. Sherma J., Dobbins M. F., Touchstone J. C., *J. Chromatogr., Sci.*, **12**, 300 (1974).
124. Городецкий С. В., *Токсикология и прикладная фармакология*, **23**, 511 (1972).
125. Steele J. A., *J. Chromatogr.*, **19**, 300 (1965).
126. Wallace J. E., Biggs J. D., Merritt J. H., Hamilton H. E., Blum K., *J. Chromatogr.*, **71**, 135 (1972).
127. Viala A., Estadieu M., *J. Chromatogr.*, **72**, 127 (1972).
128. Christopoulos G. N., Kirch E. R., *J. Chromatogr.*, **65**, 507 (1972).
129. Ragazzi E., Veronese G., Giacobazzi C., "Thin-Layer Chromatography of Alkoids on Magnesia Chromatoplates", in *Thin-Layer Chromatography*, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 149.
130. Huang J.-T., Hsiu H.-C., Wang K.-T., *J. Chromatogr.*, **29**, 391 (1967).
131. Pfeifer S., *J. Chromatogr.*, **24**, 364 (1966).
132. Pfeifer S., *J. Chromatogr.*, **41**, 127 (1969).
133. Zarnack J., Pfeifer S., *Pharmazie*, **17**, 431 (1962).
134. Bobbitt J. M., Ebermann R., Schubert M., *Tetrahedron Lett.*, **1963**, 575.
135. Doepke W., *Arch. Pharm.*, **295/67**, 605 (1962).
136. Bhatnagar A. K., Bhattarjji S., *Indian J. Chem.*, **2**, 43 (1965).
137. Klavehn M., Rochelmeyer H., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **101**, 477 (1961).
138. Klavehn M., Rochelmeyer H., Seyfreid J., *Deut. Apoth.-Ztg.*, **101**, 75 (1961).
139. Hohmann T., Rochelmeyer H., *Arch. Pharm.*, **297/69**, 186 (1964).
140. Reichelt J., Kudrnac S., *J. Chromatogr.*, **87**, 433 (1973).
141. Groeger D., Erge D., *Pharmazie*, **18**, 346 (1963).
142. McLaughlin J. L., Goyan J. E., Paul A. G., *J. Pharm. Sci.*, **53**, 306 (1964).
143. Eich E., Schunack W., *Planta Med.*, **27**, 58 (1975).
144. Groeger D., Tyler V. E., Jr., Dusenberry J. E., *Lloydia*, **24**, 97 (1961).
145. Zinser M., Baumgaertel C., *Arch. Pharm.*, **297/69**, 158 (1964).

146. Agurell S., Ramstad E., *Lloydia*, **25**, 67 (1962).
147. Hofmann A., *Planta Med.*, **9**, 354 (1961).
148. Hofmann A., Tschertter H., *Experientia*, **16**, 414 (1960).
149. Beyerman H. C., van de Linde A., Henning G. J., *Chem. Weekblad*, **59**, 508 (1963).
150. Genest K., Farmilo C. G., *J. Pharm. Pharmacol.*, **16**, 250 (1964).
151. Fowler R., Gomm P. J., Patterson D. A., *J. Chromatogr.*, **72**, 351 (1972).
152. Link E., *Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg.*, **104**, 646 (1959).
153. Schlemmer F., Link E., *Pharm. Ztg. Ver. Apoth.-Ztg.*, **104**, 1349 (1959).
154. Liokkonen A., *Farm. Aikakauslehti*, **71**, 329 (1962); *Chem. Abstr.*, **58**, 8850 (1963).
155. Ullmann E., Kassalitzky H., *Arch. Pharm.*, **295/67**, 37 (1962).
156. Court W. E., *Can. J. Pharm. Sci.*, **1**, 76 (1966).
157. Court W. E., Habib M. S., *J. Chromatogr.*, **80**, 101 (1973).
158. Bernauer K., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1075 (1964).
159. Groeger D., *Pharmazie*, **23**, 210 (1968).
160. Lutomski J., Kowalewski Z., Drost K., Kucharska M., *Herba Pol.*, **14**, 23 (1968); through *Anal. Abstr.*, **19**, 3206 (1969).
161. Rusiecki W., Henneberg M., *Ann. Pharm. Fr.*, **21**, 843 (1963).
162. Grandolini G., Galeffi C., Montalvo E., Casinovi C. C., Marini-Bettolo G. B., "Some Applications of Thin-Layer Chromatography for the Separation of Alkaloids", in *Thin-Layer Chromatography*, G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 155.
163. Weissman C., Schmid H., Karrer P., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 62 (1962).
164. Phillipson J. D., Bisset N. G., *J. Chromatogr.*, **48**, 493 (1970).
165. Jakovljevic I. M., Seay L. D., Shaffer R. W., *J. Pharm. Sci.*, **53**, 553 (1964).
166. Mokry J., Kompiš I., Spitteller G., *Collect. Czech. Chem., Commun.*, **32**, 2523 (1967).
167. Cone N. J., Miller R., Neuss N., *J. Pharm. Sci.*, **52**, 688 (1963).
168. Farnsworth N. R., Blomster R. N., Damratoski D., Meer W. A., Cammarato L. V., *Lloydia*, **27**, 302 (1964).
169. Shellard E. J., Phillipson J. D., Gupta D., *J. Chromatogr.*, **32**, 704 (1968).
170. Shellard E. J., Alam M. Z., *J. Chromatogr.*, **33**, 347 (1968).
171. Shellard E. J., Alam M. Z., *J. Chromatogr.*, **32**, 472 (1968).
172. Shellard E. J., Alam M. Z., *J. Chromatogr.*, **32**, 489 (1968).
173. Shellard E. J., Houghton P. J., *Planta Med.*, **24**, 341 (1973).
174. Kump W. G., Patel M. B., Rowson J. M., Schmid H., *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1497 (1964).
175. Kump C., Schmid H., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1090 (1962).
176. Kump W. G., Schmid H., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1503 (1961).
177. Walser A., Djerassi C., *Helv. Chim. Acta*, **48**, 391 (1965).
178. Walser A., Djerassi C., *J. Chromatogr.*, **21**, D5 (1966).
179. Agurell S., Holmstedt B., Lindgren J., Schultes R. E., *Acta Chem. Scand.*, **23**, 903 (1969).
180. Benesova V., Samek Z., Herout V., Sorm F., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 1807 (1969).
181. Dhahir H. I., Jain N. C., Thornton J. I., *Forensic Sci. Soc. J.*, **12**, 309 (1972).
182. Phillipson J. D., Shellard E. J., *J. Chromatogr.*, **24**, 84 (1966).
183. Chalmers A. H., Culvenor C. C. J., Smith L. W., *J. Chromatogr.*, **20**, 270 (1965).
184. Sharma R. K., Khajuria G. S., Atal C. K., *J. Chromatogr.*, **19**, 433 (1965).
185. Klasek A., Reichstein T., Santavy F., *Helv. Chim. Acta*, **51**, 1088 (1968).
186. Klasek A., Sedmera P., Santavy F., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **36**, 2205 (1971).
187. Matlocks A. R., *J. Chromatogr.*, **27**, 505 (1967).

188. Scharlemann W., *Naturforsch. Z.*, **27b**, 806 (1972).
189. Hěrmánek S., Schwarz V., Čekan Z., *Pharmazie*, **16**, 566 (1961).
190. Paris R. R., Paris M., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 1597.
191. Máthé I., Tyháč E., *Herba Hungarica*, **2**, 35 (1963).
192. Potešilova H., Wiedermannová J., Santavý F., *Collect. Czech., Chem. Commun.*, **34**, 3642 (1969).
193. Haag-Berrurier M., Mathis M. C., *Ann. Pharm. Fr.*, **31**, 457 (1973).
194. Habib A. A. M., *Planta Med.*, **26**, 279 (1974); through *CAMAG Bibliogr., Serv.*, **35**, 35154.
195. Kerry A., *Acta Argon. Acad. Sci. Hung.*, **24**, 3 (1975); through *CAMAG Bibliogr., Serv.*, **36**, 36148.
196. Fish F., Waterman P. G., *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**, 67 (1971).
197. Fish F., Waterman P. G., *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**, Suppl. 132S (1971).
198. Habib M. S., Harkins K. J., *Planta Med.*, **18**, 270 (1970).
199. Massa V., Gal F., Susplugas P., Maestre G., *Trav. Soc. Pharm. Montp.*, **30**, 301 (1970); through *Chem. Abstr.*, **75**, 25448p (1971).
200. Cho Y. D., Martin R. O., *Anal. Biochem.*, **44**, 49 (1971).
201. Lepri L., Desideri P. G., Lepori M., *J. Chromatogr.*, **116**, 131 (1976).

1. АЛИФАТИЧЕСКИЕ АМИНЫ

Тайхерт и др. [1] разделили ряд алкиламинов, в том числе несколько ароматических аминов, используя для этой цели различные адсорбенты и различные системы растворителей (табл. 16.1 и 16.2). Эти алкиламины можно анализировать хроматографически на слоях силикагеля, забуференного силикагеля и целлюлозы. Растворители, пригодные для разделения аминов, приведены в указанных таблицах; следует отметить, что более летучие амины нельзя хроматографировать растворителем, содержащим аммиак. Эти соединения обнаруживают, опрыскивая пластинки нингидрином или обрабатывая парами иода.

Таблица 16.1

Величины $R_f \times 100$ аминов на пластинках нейтрального и забуференного силикагеля в различных растворителях [1]^a

Амин	Нейтральные слои		
	95 %-ный этанол — 25 %-ный аммиак (4 : 1)	фенол — вода (8 : 3)	бутанол — уксус- ная кислота — во- да (4 : 1 : 5)
Метиламин	—	11	10
Этиламин	—	15	13
<i>n</i> -Пропиламин	—	30	19
Изоамиламин	—	49	39
Кадаверин	3	6	2
Путресцин	3	4	2
Этаноламин	30	18	11
Гистамин	41	26	2
Тирамин	56	44	38
Фенилэтиламин	66	56	37
Бензиламин	70	49	36
Триптамин	60	54	43

Продолжение табл. 16.1

Забуференные слои		
Амин	силикагель, забу- ференный фосфатом (рН 6,8), 70 %-ный спирт	силикагель, забуференный ацетатом натрия, бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)
Метиламин	10	7
Этиламин	20	14
<i>n</i> -Пропиламин	30	23
Изоамиламин	45	44
Кадаверин	1	1
Путресцин	1	1
Этаноламин	10	10
Гистамин	3	3
Тирамин	55	40
Фенилэтиламин	55	42
Бензиламин	50	42
Триптамин	90	45

^a С разрешения авторов и Deutsche Apotheker-Verlag.

Первичные, вторичные и третичные амины можно разделять на силикагеле смесию хлороформ—аммиак (39 : 1) и определять титриметрически после предварительного обнаружения пятен парами иода [2]. Гидрохлориды аминов разделяют [3], применяя смесь хлороформ—метанол—17 %-ный аммиак (2 : 2 : 1). Лаукнер и др. [4] разделили амины C_8 — C_{16} на слое силикагеля, пропитанном ацетатом натрия; эти авторы элюировали пробу циклогексаном, насыщенным муравьиной кислотой. Для разделения многих аминов, встречающихся в биологических системах, Аурес и др. [5] применили метод двумерного анализа на целлюлозе. Растворителями служили бутанол—0,1 н. соляная кислота в одном направлении и изо-

Таблица 16.2

Величины $R_f \times 100$ аминов, полученные на слоях целлюлозы со смесью аммиачный спирт—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 5) [1]^a

Амин	$R_f \times 100$
Метиламин	12
Этиламин	19
<i>n</i> -Пропиламин	31
<i>n</i> -Бутиламин	43
Изоамиламин	58
Этаноламин	7
Гистамин	2
Тирамин	28

^a С разрешения авторов и Deutsche Apotheker-Verlag.

пропанол—5 н. аммиак—вода (8:1:1)—в другом. Лейн [6] отделил друг от друга первичные, вторичные и третичные амины с длинной цепью на оксиде алюминия.

Фельткамп и Кох [7] провели хроматографический анализ большого числа стереоизомеров, включая 24 циклогексиламина, 8 аминодекалинов, *цис*- и *транс*-2-изопропилциклопентиламинов, борниламин и изоборниламин, на слоях силикагеля G, применяя элюент, содержащий 8 частей петролейного эфира и 17 частей смеси 2 частей концентрированного аммиака и 98 частей ацетона. Основания обнаруживали смесью равных частей 0,1 н. раствора иода и 10 %-ной серной кислоты или реактивом Драгендорфа, усовершенствованным Мунье.

Полиамины были разделены на слоях силикагеля и целлюлозы; элюентом служили насыщенные хлоридом натрия смеси моноэтиловый эфир диэтиленгликоля (карбитол)—пропанол—вода (14:3:3) и моноэтиловый эфир этиленгликоля (метилцеллозольв)—пропанол—вода (14:3:3). Для количественных исследований применяли смеси целлюлозы; после обработки нингидрином пятна элюировали и измеряли поглощение элюата в области 575 нм [8]. Для соединений данной группы приемлем также прямой денситометрический анализ [9]. В этом случае амины разделяли на слое силикагеля, элюируя смесью *трет*-бутанол—пиридин—26 %-ный аммиак (1:1:1), насыщенной газообразным аммиаком, и обнаруживали 0,08—1 %-ным раствором фенолового красного в 60 %-ном этаноле. Эйб и др. [10] предпочитают слой силикагеля, нанесенного на пластинки из спеченного стекла, и смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—пиридин—вода (12:3:6:4). Спепармин и спепармадин определяли непосредственным измерением флуоресценции после обнаружения (но не опрыскиванием) флуорескамина в ацетоне (20 мг/100 мл).

Беккетт и Хиулис [11, 12] исследовали причины многократного образования пятен при хроматографировании на бумаге и тонких слоях целлюлозы с нейтральными или слабокислыми элюентами. Они пришли к выводу, что этот эффект связан с наличием карбоксильных групп в целлюлозе. Многократного образования пятен можно избежать, предварительно обработав целлюлозу диазометаном. Автор [13] изучал причины образования двойных пятен на слоях силикагеля или оксида алюминия при разделении гидрохлорида фенфлурамина и других аминов. Сульфаты таких двойных пятен не образуют. После тщательного изучения был сделан вывод, что двойные пятна возникают в результате а) «частичного гидролиза солей аминов, вероятность которого определяется ионной силой кислоты, б) улетучивания освобождающейся соляной кислоты; в) нали-

чия заряженных групп в тонких слоях силикагеля и оксида алюминия».

Уденфренд и др. [14] предложили флуорескамин (4-фенил-спиро-[фуран-2(3Н),1'-фталандион-3,3']) в качестве реактива (Т-128) для определения соединений, содержащих группу первичного амина, в области концентраций, измеряемых пикомолями.

Лепри и др. [15] исследовали хроматографические свойства 30 алифатических аминов на слоях ионообменников дауэкса 50-Х4 (Na⁺- и H⁺-формы), карбоксилметилцеллюлозы натрия и рексина 102 (Na⁺-форма), используя для разделения соляную кислоту и различные буферные и солевые растворы.

Группу аминов анализировали методом тонкослойного электрофореза [16] на слоях силикагеля G, приготовленного с добавкой 3 %-ного раствора борной кислоты. В качестве электролита применяли смесь 80 мл этанола, 30 мл дистиллированной воды и 2 г кристаллического ацетата натрия. Величину рН доводили до 12 40 %-ным раствором гидроксида натрия. Напряженность поля составляла 10 В/см. Третичный амин триэтанолламин обнаруживали щелочным раствором перманганата, а остальные амины нингидрином. Хонеггер [17] описал двумерное разделение группы аминов: в одном направлении проводился электрофорез, в другом — хроматографирование.

Для облегчения разделения и идентификации первичных и вторичных аминов на тонких слоях было предложено большое число их производных, в том числе производные, образующиеся при реакции с 5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонилхлоридом (дансил или DANS-Cl). В виде дансилпроизводных удается обнаружить и определить очень небольшие количества (порядка наномолей) соединений, существует, однако, ряд противопоказаний к применению этого реагента: а) этот реактив нельзя считать специфичным, поскольку он реагирует с гидроксильными группами фенольных соединений и с некоторыми аминокислотами и спиртами; б) в процессе реакции образуются побочные флуоресцирующие продукты; в) при наличии основных аминокислот, как, например, в природных продуктах, в процессе дансилирования возможна фрагментация. Тем не менее с помощью этого реактива удобно определять первичные и вторичные амины; Зейлер [18, 19] составил подробную сводку преимуществ и недостатков использования этого реактива и описал методику его применения. Производные аминов готовят следующим образом. Смешивают раствор амина в воде с раствором реактива в смеси ацетон—вода (3:1). На один объем воды должно приходиться три объема смеси ацетон—вода. Реакционную смесь насыщают бикарбонатом натрия. Реакция практически завершается через несколько минут, если реактив предназначен

для количественного анализа. Зейлер [19] рекомендует выдерживать реакционную смесь при комнатной температуре в темноте 3—4 ч или в течение ночи. В том случае когда в анализируемой пробе содержится довольно много полиаминов и очень мало аминов, продукты дансирования пропускают через небольшую колонку с сефадексом LH 20, элюируя хлороформом, чтобы перед ТСХ отделить амины от полиаминов [18], после чего амины разделяют на силикагеле, элюируя смесью хлороформ—триэтиламин (5:1) [20] и хлороформ—этилацетат (3:1) или циклогексан—этилацетат (7:3) [21]. Количественное определение проводят методом флуориметрии *in situ* или опрыскивают пятна производных аминов 20 %-ным 2,2', 2''-нитриолтриэтанолом в изопропанол [21]. Разделение дансилпроизводных целесообразно вести методом двумерного разделения смесями хлороформ—метанол (3:2) в одном направлении и хлороформ—триэтиламин (5:1) в другом направлении [18], или этилацетат—циклогексан (3:4) и бензол—триэтиламин (8:1) [22], или этилацетат—циклогексан (3:2) и бензол—метанол—циклогексан (17:1:2) [23]. В последнем случае производные аммиака и диамина элюируют с пластинки и повторно анализируют пробу методом двумерной хроматографии, применяя следующие смеси: хлороформ—метанол (90:6) и хлороформ—триэтиламин (5:1).

Авторы работ [24, 25] рекомендуют проводить определение аминов с другим реактивом—7-хлор-4-нитробензокс-1,3-диазол, который сам не является флуоресцентным; авторы указанных работ считают, что этот реактив лучше DANS-Cl. Он не образует флуоресцирующих продуктов гидролиза, более специфичен по отношению к первичным и вторичным аминам, не образует флуоресцирующих продуктов с фенолами, тиолами и анилинами [26]. Производные аминов можно получить [25], нагревая в течение 1,5 ч от 1 до 20 мкг амина в 25—550 мкл метанола с 4—5 экв. 0,05 %-ного метанольного раствора реактива и 50—100 мкл 0,1 М водного раствора бикарбоната натрия при 55 °С. Реакционную смесь дважды разделяли хроматографически на слое силикагеля; первоначально смесью циклогексан—этилацетат (1:1), а затем в перпендикулярном направлении дважды смесью гептан—этилацетат—*n*-бутанол (8:1:1), можно также проводить разделение трижды на полиамидной пленке-11 (Macherey, Nagel), используя последний из упомянутых растворителей. Количественный флуориметрический анализ проводили *in situ* на полиамидных слоях.

К числу производных, применяемых в ТСХ, относятся и 3,5-динитробензамиды [1]. Их обычно получают реакцией с 3,5-динитробензоилхлоридом. Разделение проводят на силикагеле смесью хлороформ—96 %-ный этанол (99:1) (табл. 16.3) и

обнаруживают в УФ-свете или опрыскивают раствором иода в хлороформе или раствором α -нафтиламина.

Производные 2,4-динитрофенила получают следующим образом. Смешивают 5 ммоль гидрохлорида аммония и 5 ммоль 2,4-динитрофторбензола в 50 мл ацетона с 10 ммоль бикарбоната натрия в 50 мл воды при 60 °С и выдерживают 40 мин. Разделяют производные на силикагеле, используя смесь пентан—бензол—триэтиламин (45:45:10) [27]. Михалек [28] использовал метод двумерного разделения. Первое разделение он проводил смесью хлороформ—метанол (95:5) вдоль слоя силикагеля, только часть которого пропитана нитратом серебра. Для второго разделения Михалек применил верхнюю фракцию смеси метанол—тетралин—вода (9:1:1); это разделение он проводил уже в другом направлении—поперек оставшейся части слоя, пропитанного 5 %-ным раствором тетралина в эфире. Этот метод позволяет разделить насыщенные, моноеновые и диеновые основания с длинной цепью и продукты их разложения.

В ТСХ используют также 4-(диметиламино)-3,5-динитробензамиды [29, 30], их разделяют на смеси кизельгур—карбовакс (4:1) с помощью смешанного растворителя гексан—этилацетат (7:3), и 4-(4-нитрофенилазо)бензамиды [31, 32], которые анализируют на силикагеле с применением смеси хлороформ—ацетон (20:1). Производные 9-изотиоцианатакридина [33] подвергают хроматографическому разделению на целлюлозе, элюируя смесью диметилформамид—хлороформ—28 %-ный аммиак (5:13:3), 4-(фенилазо)бензолсульфамиды [34] анализируют на оксиде алюминия со смесью этилацетат—петролейный эфир (62—82 °С) (1:4); *n*-(*N,N*-диметиламино)бензол-*n'*-азобензамиды [35] разделяют на силикагеле с помощью ряда растворителей, включая циклогексан—метилэтилкетон (7:3). Производные енаминов (β -аминовинил-*o*-оксифенилкетоны) [36] хроматографируют на силикагеле со смесями этилацетат—бензол (1:5), хлороформ—ксилол (4:1) или ксилол—ацетон (9:1). Эфиры *n*-толуолсульфокислоты [37] анализируют на силикагеле, забуференном 0,5 н. щавелевой кислотой, применяя такие

Таблица 16.3

Величины $R_f \times 100$ производных 3,5-динитробензамиды и ряда аминов, полученные на силикагеле [1] ^a

Амины	CHCl ₃ —96 %-ный C ₂ H ₅ OH (99:1)
Метиламин	14
Диметиламин	47
Этиламин	22
Диэтиламин	68
<i>n</i> -Пропиламин	35
Изобутиламин	42
Изоамиламин	50

^a С разрешения авторов и Deutsche Apotheker-Verlag.

растворители, как а) хлороформ, б) хлороформ—ксилол (4:1), в) хлороформ—ксилол (19:1); на нейтральном оксиде алюминия с а), б) или г) петролейный эфир—эфир (1:1), на основном или кислом оксиде алюминия с растворителями б), в) или г).

2. АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНЫ

Ямамото [38] разделил *о*- и *п*-фенилендиамины методом радиальной хроматографии на японской кислой глине.

Силикагель, осажденный в присутствии метилфениламина [39], обнаруживает преимущественную адсорбцию этого соединения и метилового оранжевого по сравнению с этилфениламином или этиловым оранжевым. Противоположный эффект наблюдают, готовя гель в присутствии этилфениламина. Разделение группы дифениламинов [40, 41] описано в разделе, посвященном взрывчатым веществам.

орто-, *мета*- и *пара*-Нитроанилины делили на незакрепленных слоях оксида алюминия [42] и силикагеля [43]. Шварц и др. [44] разделяли методом распределительной ТСХ гомологические ряды динитрофениламинов; Кесвани и Вебер [45] анализировали нитроанилины и родственные соединения на силикагеле G, применяя смесь гексан—ацетон (3:1). Обнаружение они осуществляли а) 5 %-ным раствором 1-нафтола в метаноле, б) смесью растворов 0,1 М хлорида железа (III) и 0,1 М феррицианида калия и в) последовательным опрыскиванием 5 %-ным раствором нитрита натрия в 1 н. соляной кислоте, 5 %-ным фенолом и 7 %-ным раствором карбоната натрия. Джиллио-Тос и др. [46] подробно исследовали разделение изомерных замещенных в кольце анилинов на силикагеле G с пятью различными системами растворителей. В табл. 16.4 приведены величины R_f этих соединений. Шерма и Марцони [47] разделили группу из восьми анилинов и трех аминафенолов на имеющихся в продаже адсорбционных слоях двух силикагелей, оксиде алюминия и двух полиамидах. На силикагеле элюирование велось смесью бензол—этанол (95:5), бензол—метанол (4:2) и бензол—ацетон (7:2); при разделении на оксиде алюминия использовали смесь бензол—метанол (85:15); для слоев полиамидов применяли смесь бензол—метанол (9:1). Обнаружение пятен осуществляли обработкой раствором флуорескамина в ацетоне (0,1 мг/мл) с последующим опрыскиванием 10 %-ным раствором триэтиламина в метиленхлориде для стабилизации флуоресценции при количественных определениях, а также методом прямой флуориметрии на слоях силикагеля. Чувствительность определения колеблется в пределах от 4 до 80 нг. Ринде и Тролл [48] при разработке колориметрического анализа ароматиче-

ских аминов использовали раствор 1 мг/мл флуорескамина в ледяной уксусной кислоте, поскольку этот раствор реагирует только с ароматическими аминами, образуя устойчивые желтые продукты. Раствор реактива устойчив при комнатной температуре в течение многих недель. Разделение проводили на силикагеле, применяя смесь хлороформ—уксусная кислота—метанол (18:1:1). Табак и др. [49] провели хроматографический анализ смеси 10 замещенных анилинов на силикагеле, а также на силикагеле, пропитанном комплексообразователем—оксидом серебра. Элюентами служили петролейный эфир—этилацетат (1:1) и петролейный эфир—этилацетат—бензол (6:3:1). Ясуда провел хроматографический анализ ароматических аминов на слоях силикагеля, пропитанных солями марганца [50] и ацетатом кадмия [51], и галогензамещенных анилинов на слоях, пропитанных солями цинка [52].

Пастушка и Петрович [53] анализировали хроматографически азотосодержащие производные бензола, фенола, толуола, хлорбензола, азобензола, бензотриазола, феназина и бензидина. В работе этих авторов приведены величины R_f , полученные с такими элюентами, как бензол, бензол—метанол (4:1) и бензол—диоксан—уксусная кислота (90:25:4). Лепри и др. [54] провели хроматографический анализ смеси 45 первичных ароматических аминов на тонких слоях ряда анионообменников: AG 1-X4 (CH₃COO⁻), AG 1-X4 (ClO⁻), дауэкс 50X-4 (H⁺), целлекс D (CH₃COO⁻), натрийкарбоксиметилцеллюлозе и на микрористаллической целлюлозе. Двадцать аминов исследованы методом электрофореза на тонких слоях AG 1-X4 (CH₃COO⁻). Дункан и др. [55] провели хроматографический анализ смеси девяти ароматических аминов на слоях целлюлозы, пропитанных жидким ионообменником бис-(2-этилгексил)фосфатом.

Для облегчения разделения и идентификации этих соединений были также использованы производные ароматических соединений. Например, Парихар и др. [56] приготовили производные 2,4-динитрофенила для хроматографического анализа смеси 11 ароматических аминов. Величины R_f были определены на силикагеле, на забуференном диоксиде кремния, нейтральном, основном и кислом оксиде алюминия и на кизельгуре G с девятью смесями растворителей. Можно также применять производные дансила; Чепмен и др. [57] хроматографически проанализировали смесь 128 фенилалкильных производных на силикагеле, используя следующие смеси: этилацетат—циклогексан (9:12), четыреххлористый углерод—триэтиламин (5:1) и триэтиламин—*n*-бутилацетат (1:5). Были сняты также масс-спектры этих производных. Чтобы получить окрашенные производные, удобные для проведения хроматографического анализа, после

Таблица 16.4

Величины $R_f \times 100$ некоторых ароматических аминов на силикагеле [46] ^а

Амин	Растворитель				
	А	Б	В	Г	Д
о-Толуидин	62	42	64	17	84
м-Толуидин	54	29	63	10	83
п-Толуидин	40	20	59	5	80
о-Аминофенол	34	24	58	0	80
м-Аминофенол	29	13	53	0	75
п-Аминофенол	6	1	12	0	62
о-Аминобензойная кислота	62	47	74	44	98
м-Аминобензойная кислота	50	28	61	12	95
п-Аминобензойная кислота	59	37	68	29	97
о-Анизидин	60	42	70	15	81
м-Анизидин	51	30	62	9	80
п-Анизидин	11	2	17	2	58
о-Нитроанилин	69	55	77	52	93
м-Нитроанилин	64	44	71	36	92
п-Нитроанилин	58	37	67	29	91
о-Фенилендиамин	0	0	0	0	63
м-Фенилендиамин	0	0	0	0	53
п-Фенилендиамин	0	0	0	0	40
о-Броманилин	81	78	85	69	95
м-Броманилин	70	58	75	44	93
п-Броманилин	61	47	67	27	89
о-Хлоранилин	78	75	82	66	96
м-Хлоранилин	68	51	75	40	94
п-Хлоранилин	60	41	64	22	89

^а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.^б А — дибутиловый эфир—этилацетат—уксусная кислота (10:10:1); Б — дибутиловый эфир—этилацетат—уксусная кислота (15:5:1); В — дибутиловый эфир—этилацетат—уксусная кислота (5:15:1); Г — дибутиловый эфир—уксусная кислота—*n*-гексан (20:1:4); Д — уксусная кислота—*n*-бутанол—вода (1:4:5).

диазотирования аминов проводят реакцию сочетания с 1- и 2-нафтолами и другими соединениями [58, 59].

Для обнаружения аминов при прямом хроматографическом анализе применяется очень много реактивов. Барни и др. [60] исследовали группу реактивов и нашли, что наиболее подходящим является 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон, хотя он реагирует и с соединениями других классов. Авторы установили, что *n*-(диметиламино)бензальдегид позволяет обнаружить большинство ароматических аминов и некоторые алифатические амины, причем чувствительность обнаружения выше, чем с другими исследованными реактивами. Реакции диазотирования и сочетания можно проводить непосредственно на слое (проба Т-78) [61]; эту реакцию сравнивали с действием 12 других реактивов. Ретни [62] проводил диазотирование аминов, выдерживая пластинки в атмосфере диоксида азота, и затем опрыскивала их 0,1 М раствором β-нафтола и 0,1 М раствором триэтиламина в бензоле. Чувствительность колебалась в пределах от 0,1 до 0,3 мкг, хотя в некоторых случаях требовались большие количества соединений. Для обнаружения и дифференциации ариламинов и арилоксиаминов Стюарт и Стернсон [63] использовали чувствительную реакцию с 9-хлораκριдином (проба Т-62).

3. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Мистрюков [64] разделил 34 первичных и вторичных амина, главным образом производных декагидрохинолина и пергидропиридина, используя шесть различных смесей растворителей, на незакрепленных слоях оксида алюминия с активностью III по Брокману [65]. Чтобы заставить перемещаться по слою наиболее прочно адсорбированные соединения, приходилось применять растворители, содержащие аммиак. Петрович [66—68] анализировал на силикагеле G некоторые производные хинолина, а также некоторые другие соединения, встречающиеся в дегте [69]. Янак и др. [70, 71] проводили анализ хинолина и других азотсодержащих гетероциклических соединений на более полярном силикагеле. В качестве элюентов в этом случае пригодны хлороформ, бензол и другие более полярные растворители (табл. 16.5). Для обнаружения соединений применяли реактив Драгендорфа [68] или тетрацианэтилен [70, 72].

Бендер и др. [73, 74] и Савицкий и др. [75] использовали ТСХ и спектрофотометрию для определения свойств карбазолов и многоядерных карбазолов, выделенных из воздуха, загрязненного дымами, содержащими выбросы дегтя. В табл. 16.6 приведены величины R_f этих соединений, полученные на оксиде алюминия с использованием смеси пентан—хлороформ (3:2) и гидроксида аммония. Смесь пентан—хлороформ

Таблица 16.5

Величины $R_f \times 100$ некоторых хинолинов и других азотсодержащих гетероциклических соединений в различных системах

Азотсодержащие гетероциклические соединения	Силикагель G				Незакрепленные слои силикагеля РНН (Spolana N. E.)	
	Длина пути разделения 10 см				хлороформ [70]	бензол [70]
	хлороформ [68]	бензол [67,69]	бензол — метанол (95 : 5) [67,69]	метанол [67,69]		
Хинолин	11	9	30			2
Изохинолин	12	7	22			3
2-Метилхинолин	16	4	27	89	40 ^a	4
4-Метилхинолин	13	2	22	82	40 ^a	4
6-Метилхинолин	18	5	26	86		
7-Метилхинолин	16					3
8-Метилхинолин	31	17	53	94	38 ^a	3
1-Метилизохинолин					29 ^a	2
3-Метилизохинолин	11					2
2,4-Диметилхинолин	8					
2,6-Диметилхинолин	11					4
2,8-Диметилхинолин	47					
Акридин	19					0
3,4-Бензохинолин	19					
5,6-Бензохинолин	13					
7,8-Бензохинолин	47					
3,4-Бензакридин	75					1
Индол					63	65
2-Метилиндол					60	65
3-Метилиндол					70	65
5-Метилиндол					65	65
7-Метилиндол					65	64
Карбазол					75	74
2-Метилкарбазол					70	77

^a Размытие с самого начала задней границы.

Таблица 16.6

Ориентировочные величины $R_f \times 100$ некоторых многоядерных карбазолов на оксиде алюминия [74]

Соединение	Пентан — хлороформ (3 : 2)	Гидроксид аммония	Флуоресцентная окраска ^a	Чувствительность, мкг
Карбазол	50	<2	Синяя	0,02
1Н-Бензо(а)карбазол	46	<2	„	0,02
5Н-Бензо(б)карбазол	39	<2	Желтая	0,006
7Н-Бензо(с)карбазол	37	<2	Синяя	0,2
4Н-Бензо(def)карбазол	49	60	„	0,01
7Н-Дибензо(с, g)карбазол	30	<2	„	0,025

^a С 29 %-ным раствором гидроксида тетраметиламмония в метаноле.

особенно удобна для отделения группы карбазолов от многоядерных ароматических углеводородов, которые перемещаются с фронтом растворителя, и фенольных соединений, остающихся вблизи исходной точки. Гидроксид аммония в качестве растворителя полезен при отделении соединений типа 4Н-бензо(def)карбазола от других карбазолов. Кроме того, 25 %-ный водный раствор N,N-диметилформамида можно использовать для отделения на слоях целлюлозы карбазола с R_f 0,4 и 4Н-бензо(def)карбазола с R_f 0,24 от остальных бензокарбазолов, у которых R_f меньше 0,14. Соединения эти можно обнаружить по флуоресценции в УФ-свете. Чувствительность определения можно в большинстве случаев усилить, нанося микрокаплю 29 %-ного раствора гидроксида тетраэтиламмония в метаноле. Савицкий и др. [76] отделяли также азогетероциклические соединения от многоядерных ароматических углеводородов на слоях целлюлозы, элюируя их смесью муравьиная кислота—вода (1 : 1). В этой системе углеводороды остаются в исходной точке, а гетероциклические соединения характеризуются величинами R_f от 0,6 до 0,9. Для этих же целей можно воспользоваться и другими комбинациями адсорбент—растворитель. Двадцать два азогетероциклических соединения были разделены при использовании следующих трех систем: 1) целлюлоза, диметилформамид—вода (35 : 15); 2) целлюлоза, уксусная кислота—вода (3 : 7); 3) оксид алюминия, гексан—диэтиловый эфир (19 : 1). В качестве реактива для обнаружения была применена трифторуксусная кислота. Та же группа ученых [77, 78] провела более обширное

Некоторые комбинации растворитель—адсорбент, применяемые для разделения различных типов азотсодержащих гетероциклических соединений

Тип соединения	Адсорбент	Растворители	Литература
Пироллы	Диоксид кремния	$C_6H_{14}-CHCl_3$ (9:1) 3 X; эфир — 2% θ -ная НАс в гексане (1:1)	79, 80
Пирроловые кисты	"	$CHCl_3$ — 96% θ -ная НАс (1:1); Vz — MeOH — НАс (45:8:4)	81
Пиридины	"	Vz — MeOH (25:1); EtAc — MeOH — НАс (15:4:1); эфир — ДМФ (89:1)	82, 83, 84 ^a
Пиперидины	Диоксид кремния — Ag_2O	$Me_2CO-C_6H_6$ (2:3); MeCOEt — <i>изо</i> -PrOH (4:1); $CHCl_3$ —MeOH (3:2)	84 ^a
Хинолины	Оксид алюминия	$CHCl_3$, насыщ. NH_4OH	85
Пиразолы	Диоксид кремния	EtAc — <i>изо</i> -PrOH— NH_4OH (9:6:4); Vz — EtAc (1:1)	86 ^a , 87
Пиразолон	"	EtAc (насыщ. H_2O) — $CHCl_3-CH_3COCH_3$ (7:3); метилэтилкетон	88, 89
Пиразолидины	"	циклогексан — $CHCl_3-EtOH$ (4:10:1); циклогексан — $CH_3CO_2H_5$ (4:5)	90
Пиперазины	Оксид алюминия	Бензол, хлороформ	91
Диамнопиридинны	Диоксид кремния	EtAc—MeOH (4:1); $CHCl_3$ —MeOH — НАс (14:2:1)	92, 93 ^a
	"	$CHCl_3$ —MeOH (3:1)	94
Имдазолы	"	$CHCl_3-CH_3COCH_3$ — НАс (34:4:3); EtAc, насыщ. NH_4OH	95, 96 ^a
Имдазолины	"	Vz— CH_3COCH_3 — 25% θ -ный NH_4OH (4:17:1)	97
Карбазолы	Диоксид кремния	Vz; EtAc—MeOH—НСООН — пиридин (75:7.5:7.5:10); EtOH	98, 99 ^a , 100
Азины	Оксид алюминия	Петрол: эфир (40—60°C)— $CHCl_3$ (10:1); петрол. эфир — НАс (10:1)	101
Триазолы	"	Vz— $CHCl_3$ (1:1)	102
Индолы	"	Гексан — Vz (1:1), 1% θ -ный адипинат в смеси ксилол — НСООН (49:1)	103 ^a
	Диоксид кремния	VuOH — НАс — H_2O (2:1:1); эфир — НАс (10:1); $C_6H_5OH-H_2O$ (4:1)	104, 105 ^a , 106 ^a
	"	<i>изо</i> -PrOH — 25% θ -ный NH_4OH-H_2O (20:1:2); VuOH—EtOH — циклогексамид (76:3:6)	107 ^a , 108
	"	$CH_3COCH_3-CHCl_3-НАс-H_2O$ (8:8:4:1); MeCOEt—MeOH — конд. NH_4OH (40:10:1)	105 ^a , 106 ^a
Эфиры индола	Целлюлоза	VuOH—НАс— H_2O (12:3:5); Vz — диоксан — H_2O (1:1:1); Vz — пиридин — H_2O (1:1:1)	109, 110 ^a
	Полиамид	$CHCl_3-EtAc-НАс$ (7:2:1); $CHCl_3$ — циклогексан — VuOH—НАс— H_2O	111 ^a , 112
	Диоксид кремния	Октанол — петрол. эфир (110—115°C) (1:5)	

^a В статье приведены дополнительные комбинации растворителей.

Таблица 16.8

Величины $R_f \times 100$ производных пиридина, полученные на силикагеле G с рядом растворителей [68] ^а

Производные пиридина	Растворитель ^б		
	хлороформ	этилацетат	ацетон
Пиридин	4	29	54
2-Метилпиридин	3	30	54
3-Метилпиридин	6	35	55
4-Метилпиридин	4	27	48
2,4-Диметилпиридин	4	28	49
2,6-Диметилпиридин	6	36	59
2,4,6-Триметилпиридин	2	26	51
2-Этилпиридин	3	42	62
2- <i>n</i> -Пропилпиридин	12	47	64
2-Оксопиридин	0	6	20
3-Оксопиридин	0	23	53
4-Оксопиридин	0	0	2
2-Аминопиридин	>0	27	50
3-Аминопиридин	>0	18	45
4-Аминопиридин	>0	5	14
α -Пиридинкарбинол	>0	18	45
β -Пиридинкарбинол	>0	13	39
γ -Пиридинкарбинол	>0	4	39
α -Пиридинальдегид	11	51	67
β -Пиридинальдегид	4	33	58
γ -Пиридинальдегид	5	36	56
α -Пиридинкарбоновая кислота	0	2	4
β -Пиридинкарбоновая кислота	0	6	6
γ -Пиридинкарбоновая кислота	0	5	5
α, α -Пиридинкарбоновая кислота	4	3	5
2-Ацетилпиридин	20	57	69
2-Бензоилпиридин	9	62	71
2-Фторпиридин	24	62	69
2-Хлорпиридин	28	61	70
2-Бромпиридин	26	63	72

Производные пиридина	Растворитель ^а		
	хлороформ	этилацетат	ацетон
3-Хлорпиридин	16	56	65
3-Бромпиридин	13	57	67
3-Иодпиридин	13	58	70

^а С разрешения авторов и Alfred Huethig Verlag.

^б Длина пути разделения для всех растворителей 10 см.

исследование этих и других соединений, обнаруживаемых в продуктах сгорания.

При разделении гетероциклических соединений методом ТСХ возможны самые различные комбинации растворителей и адсорбентов, некоторые из таких комбинаций приведены в табл. 16.7.

Работая с соединениями индола, Саджи [114] обнаружил, что если пластинки с пробой сушат более 2 ч, наблюдаются существенные потери, например, индолилуксусной кислоты. В тех случаях, когда задержки с началом разделения не удастся избежать, автор советует применять слой целлюлозы, на которых потеря соединений не происходит. При анализе индолов полезна также двумерная ТСХ. На слоях силикагеля элюирование проводят следующими смесями растворителей: а) изопропанол—25 %-ный аммиак—вода (20:1:2); б) *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (15:3:5) [107]; а) метилацетат—изопропанол—25 %-ный аммиак (9:7:4); б) хлороформ—метанол—96 %-ная уксусная кислота (9:4:1) [115] и а) бензол—диоксан (13:7), б) диизопропиловый эфир—*N,N*-диметилформамид (4:1) [116]. Перед хроматографическим разделением индоловые кислоты метилировали диазометаном [113, 116]. Для двумерного разделения на целлюлозе используют следующие смеси: пропанол—вода—аммиак (75:25:2) и пропанол—вода—уксусная кислота (75:25:2) [117]. Иори [117а] описал методику разделения некоторых производных индола тонкослойным электрофорезом.

Для обнаружения этой группы соединений разработан ряд реактивов. Пирролы обнаруживают реактивом Эрлиха (Т-90). Пиридины обнаруживают с помощью иодидно-азидного реактива (Т-147) и реактива Драгендорфа. В табл. 16.8 приведены величины R_f группы производных пиридина. Пиразолы обнаруживают нитропруссидом натрия (Т-237) [88], пиразолоны—1 %-ным раствором нитрата ртути, раствором иода в иодиде калия либо смесью 10 %-ного раствора ферроцианида и 12,5 %-ной соляной

кислоты (1:1) [90], имидазолы—иодоплатинатом. Индолы можно обрабатывать реактивами Эрлиха (Т-90), Ван Урка (Т-89) и Прохазки (Т-132). В табл. 16.9 приведены некоторые величины R_f ряда индолов и указана окраска пятен, наблюдаемая при обработке пластин реактивом Ван Урка.

4. РАЗЛИЧНЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Для проверки чистоты нитрофуразона Берд и Стевенс [120] использовали ТСХ. Указанное соединение иногда содержит примесь 5-нитро-2-фурфуральазина. Наличие этой примеси легко установить, поскольку она перемещается с фронтом растворителя, тогда как нитрофуразон характеризуется R_f около 0,23. Для разделения на слоях силикагеля применяли смесь бензол—ацетон (3:2).

Обнаружение и определение N-нитрозаминов приобрело особо важное значение вследствие возможного присутствия канцерогенных соединений этого класса в продуктах питания. Прейсман и др. [121] сумели разделить на силикагеле алкил- и арил-нитрозамины, а также циклические нитроамины. Элюирование велось смесью гексан—диэтиловый эфир—дихлорметан, в первом случае соотношение компонентов смеси составляло 4:3:2, во втором — 5:7:10. Предложен новый реактив для опрыскивания, позволяющий обнаружить 0,5 мкг нитроамина (1—2 мкг летучих нитроаминов) (Т-100). При разработке микроанализа этих веществ в продуктах питания Айзенбранд и др. [122] установили 4 основных положения, которыми следует руководствоваться: а) при нанесении проб необходимо пользоваться хорошо осушенным дихлорметаном; б) чтобы избежать потерь летучих нитроаминов, разбавленные экстракты нужно концентрировать в испарителе Кудерна—Даниша; в) проводить разделение необходимо в темноте при 4 °С; г) толщина слоя адсорбента должна быть не менее 0,6 мм. Айзенбранд и соавторы также отмечают, что нитроамины можно количественно извлечь с адсорбента отгонкой с паром. Васундхара и др. [123] нашли, что разделение нитроаминов на силикатах магния происходит лучше при элюировании смесью петролейный эфир (40—60 °С)—циклогексан (19:1) или толуол—дихлорметан (9:1). Сен и Дальпе [124] смогли обнаружить эти соединения в алкогольных напитках, причем концентрация нитроаминов составляла (0,25—0,1) · 10⁻⁴ %, а степень извлечения равнялась 20—100 %.

Байзер [125] выделил соединения четвертичного аммония на слоях целлюлозы, используя метод клиновидной полосы. Со смесью хлороформ—метанол—вода (75:22:3) было достигнуто прекрасное разделение. Для обнаружения Байзер применял реактив Драгендорфа. На слоях оксида алюминия с раство-

Таблица 16.9
Величины $R_f \times 100$ некоторых производных индола, полученные на силикагеле с различными растворителями^a

Производное индола	Растворитель ^б							Окраска с реактивом Ван Урка [119]
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	
Индол	84	73						От темно-красной до фиолетовой
Скатол	87	78						Синяя
3-Оксиметилиндол	84	45						Розовая
Индол-3-альдегид	81	20	29			68		Желтая ^в
Индол-3-ацетальдегид	86	46	4			17		Красновато-коричневая
Индол-3-карбоновая кислота			10	57			34	Красная
Индол-3-уксусная кислота	31	28	1	29		6	11	Сине-фиолетовая
β-Индол-(3)-пропионовая кислота	38	34	1	37		10	19	Синяя
γ-Индол-(3)-масляная кислота	40	38	2	44		14	27	"
β-Индол-(3)-акриловая кислота	33	29	49	70			78	Розовая
Индол-(3)-ацетонитрил	85	46	16	29			57	Серая
Индол-(3)-ацетамид								Сине-фиолетовая

Производные индола	Растворитель б						Окраска с реактивом Ван Урка [119]
	А	Б	В	Г	Д	Е	
5-Оксииндол-(3)-уксусная кислота	19	4	61	77	75	80	От синей до фиолетовой
Этилиндол-(3)-ацетат			30	55	70	67	Фиолетовая
Индол-(3)-этанол							Серовато-синия (желтый ободок)
Триптамин	77	0					Сине-зеленая
Серотонин	65	0					Серая
Граммин	77	0					От желтой до бежевой
DL-Триптофан	23	0					Сине-зеленая
DL-5-Метилтриптофан	28	0					Синия
DL-5-Окситриптофан	14	0					Серовато-синия
Изагин	75	27					Устойчиво оранжевая

^а Толщина слоя 0,5 мкг; длина пути разделения 10 см; камера для разделения с насыщенной атмосферой.
^б А — метилацетат—изопропанол—25 %-ный гидроксид аммония (9:7:4) [118]; Б — хлороформ—96 %-ная уксусная кислота (95:5) [118]; В — хлороформ—четырехлористый углерод—метанол (5:4:1) [119]; Г — хлороформ—96 %-ный этанол (9:1) [119]; Д — этилацетат—изопропанол—вода (65:24:11) [119]; Е — хлороформ—четырехлористый углерод—метанол (2:1:1); Ж — хлороформ—96 %-ный этанол (13:7) [119].
^в Шгаль и Калдвей [118] получили розовую окраску.

рителем циклогексан—хлороформ—этанол—уксусная кислота (4:3:2:1) Валди [126] получил для холина величину R_f , равную 0,62. При элюировании смесью циклогексан—хлороформ—уксусная кислота (9:9:2) четвертичные аммониевые основания неостигмин, берберин, соли [1-метил-2-(10-фенотиазинил)этил]-триметиламмония дают следующие величины R_f : 0,47; 0,55 и 0,60. Ньюхолл и Пирингер [127] обнаружили два соединения четвертичного аммония, которые в ходе хроматографического анализа на оксиде алюминия разлагаются с образованием своих предшественников — аминов. Соединения четвертичного аммония целесообразно анализировать методом двумерного разделения, проводя в одном направлении электрофорез, а в другом направлении, перпендикулярном первому, хроматографирование [128].

Вернин и Метцгер [129] анализировали методом ТСХ производные тиазола с Cl, SCH₃, OH, NH₂ или SH в положении 2 и с фенильной, *n*-бромфенильной, *n*-хлорфенильной, *n*-метокси-фенильной или *n*-нитрофенильной группами в положении 4.

Шмид и др. [130] исследовали разделение продуктов метаболизма катехинамина и серотонина. Поттер и др. [131] также хроматографически разделяли катехинамины и их метаболиты, а Шнайдер и Гиллис [132] изучали биосинтез катехинамина, Мейталер и др. [133] исследовали накопление аминов тромбоцитами. Вахиди и Санкар [134] определяли методом распределительной хроматографии на тонких слоях целлюлозы катехинамины и их метаболиты. Для элюирования были использованы три смеси растворителей: *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (5:1:3), этилацетат—уксусная кислота—вода (5:1,5:5,3) и *n*-бутанол—этилацетат—уксусная кислота—вода (2:3:1:3). Во всех случаях нижнюю фракцию применяли как неподвижную. Обнаружение веществ проводили 20 %-ным раствором фенольного реактива Фолина в воде. На слоях силикагеля удалось также разделить ацетильные производные этих соединений [135, 136]. Дворжак и Хук [137] осуществили количественное определение, пользуясь принципом тушения флуоресценции, а также методом отражения [138] после 2-дневной экспозиции пластинок в рассеянном дневном свете; во время выдержки происходит фотохимическая реакция. Джонсон и Букма [139] разделили такие соединения, как допа, допамин и норадреналин, на целлюлозе MN33GF, элюируя их смесью бутанол—этанол—1 М уксусная кислота (7:2:2). Бауман и др. [140] для анализа этих соединений на целлюлозе использовали смесь метилэтилкетон—ацетон—2,5 н. уксусная кислота (2:1:1). Сапира [141] применял полиамидные слои Волема, смеси элюентов изобутанол—уксусная кислота—циклогексан (80:7:10) и обнаруживающие реактивы Т-249, Т-180 и Т-114. Зайлер и Вихман [142] разделили дансил-производные этих соединений на слоях силикагеля методом

двумерного элюирования. Они применяли две смеси растворителей: а) дважды в одном направлении хлороформ, а затем дважды в перпендикулярном направлении смесь бутилацетат—циклогексан—этилацетат—триэтиламин (11:10:4:4) или б) вначале изопропиловый эфир, чтобы удалить следы дансилхлорида, затем в том же направлении смесь бутилацетат—триэтиламин (5:1), а далее в направлении, перпендикулярном первому, смесь триэтиламин—диизопропиловый эфир (5:1).

Аминоспирты анализировали на силикате магнезия и на нейтральном оксиде алюминия со смесью *n*-пропанол—вода—хлороформ (6:2:1) [143]. На нейтральном силикагеле аминоспирты элюировали смесью метилхлорид—этанол—95 %-ный аммиак (43:43:15) [144]. Эти соединения можно обнаруживать нингидрином, а для дальнейшей идентификации пластинку можно опрыскать 0,2 %-ным раствором ализарина в уксусной кислоте. Фосфатидилэтанолламины можно фракционировать в соответствии с числом двойных связей на диоксиде кремния, пропитанном нитратом серебра, элюируя смесью хлороформ—метанол—0,5 %-ная уксусная кислота (65:25:4) [145].

ЛИТЕРАТУРА

1. Teichert K., Mutschler E., Rochelmeyer H., Deut. Apoth.-Ztg., **100**, 283 (1960).
2. Voogt P., Fette, Seifen, Anstrichm., **68**, 825 (1966).
3. Gnehm R., Reich H. U., Guyer P., Chimia (Aarau), **19**, 585 (1965).
4. Lauckner J., Helm E., Fuerst H., Chem. Tech. (Berlin), **18**, 372 (1966).
5. Aures D., Fleming R., Hakanson R., J. Chromatogr., **33**, 480 (1968).
6. Lane E. S., J. Chromatogr., **18**, 426 (1965).
7. Feltkamp H., Koch F., J. Chromatogr., **15**, 314 (1964).
8. Hammond J. E., Herbst E. H., Anal. Biochem., **22**, 474 (1968).
9. Wiesner I., Wiesnerová L., J. Chromatogr., **114**, 411, (1975).
10. Abe F., Samejima K., Anal. Biochem., **67**, 298 (1975).
11. Beckett A. H., Choulis N. H., 23rd Intern. Kongr. der Pharmaz. Wissenschaften, Muenster, September 9—14, 1963.
12. Beckett A. H., Choulis N. H., J. Pharm. Pharmacol., **15**, 236T (1963).
13. Wesley-Hadzija B., J. Chromatogr., **79**, 243 (1973).
14. Udenfriend S., Stein S., Boehlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M., Science, **178**, 871 (1972).
15. Lepri L., Desideri P. G., Coas V., J. Chromatogr., **79**, 129 (1973).
16. Pastuska G., Trinks H., Chem.-Ztg., **86**, 135 (1962).
17. Honegger C. G., Helv. Chim. Acta, **44**, 173 (1961).
18. Seiler N., J. Chromatogr., **63**, 97 (1971).
19. Seiler N., Wiechmann M., "TLC Analysis of Amines as Their DANS-Derivatives", in Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. 1, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1970, p. 95.
20. Fleisher J. H., Russell D. H., J. Chromatogr., **110**, 335 (1975).
21. Gruger E. H., Jr., J. Agric. Food Chem., **20**, 781 (1972).
22. Creveling C. R., Kondo K., Daly J. W., Clin. Chem., **14**, 302 (1968).

23. Askar A., Rubach K., Schormueller J., Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **1**, 187 (1972).
24. Gosh P. B., Whitehouse M. W., Biochem. J., **108**, 155 (1968).
25. Klimisch H.-J., Stadler L., J. Chromatogr., **90**, 141 (1974).
26. Lawrence J. F., Frei R. W., Anal. Chem., **44**, 2046 (1972).
27. Ilert H.-J., Harimann T., J. Chromatogr., **71**, 119 (1972).
28. Michalec C., J. Chromatogr., **41**, 267 (1969).
29. Zeman A., Wirotama I. P. G., Z. Anal. Chem., **259**, 351 (1972).
30. Wirotama I. P. G., Ney K. H., J. Chromatogr., **61**, 166 (1971).
31. Neurath G., Doerk E., Chem. Ber., **97**, 172 (1964).
32. Heyns K., Harke H. P., Scharmann H., Gruetzmacher H. F., Z. Anal. Chem., **230**, 118 (1967).
33. Sinsheimer J. E., Hong D. D., Stewart J. T., Fink M. L., Burckhalter J. H., J. Pharm. Sci., **60**, 141 (1971).
34. Jart A., Bigler A. J., J. Chromatogr., **29**, 255 (1967).
35. Churáček J., Pechová H., Tocksteinová D., Zikova Z., J. Chromatogr., **72**, 145 (1972).
36. Kostka K., J. Chromatogr., **49**, 249 (1970).
37. Parihar D. B., Sharma S. P., Tewari K. C., J. Chromatogr., **24**, 443 (1966).
38. Yamamoto D., Nippon Kagaku Zasshi, **79**, 1030 (1958); through Chem. Abstr., **53**, 8847 (1959).
39. Erlenmeyer H., Bartels H., Helv. Chim. Acta, **47**, 46 (1964).
40. Hansson J., Explosivstoffe, **10**, 73 (1963).
41. Hansson J., Alm A., J. Chromatogr., **9**, 385 (1962).
42. Heřmánek S., Schwarz V., Čekan Z., Pharmazie, **16**, 566 (1961).
43. Waksmundzi A., Rozylo J., Oscik J., Chem. Anal. (Warsaw), **8**, 965 (1963).
44. Schwartz D. P., Brewington R., Parks O. W., Microchem. J., **8**, 402 (1964).
45. Keswani C. L., Weber D. J., J. Chromatogr., **30**, 130 (1967).
46. Gillio-Tos M., Previtera S. A., Vimercati A., J. Chromatogr., **13**, 571 (1964).
47. Sherma J., Marzoni G., Am. Lab., **6**, 21 (1974).
48. Rinde E., Troll W., Anal. Chem., **48**, 542 (1976).
49. Tabak S., Mauro A. E., Del'Acqua A., J. Chromatogr., **52**, 500 (1970).
50. Yasuda K., J. Chromatogr., **87**, 565 (1973).
51. Yasuda K., J. Chromatogr., **72**, 413 (1972).
52. Yasuda K., J. Chromatogr., **74**, 142 (1972).
53. Pastuska G., Petrowitz H.-J., Chem.-Ztg., **88**, 311 (1964).
54. Lepri L., Desideri P. G., Coas V., J. Chromatogr., **90**, 331 (1974).
55. Duncan G., Kitching L., Graham R. J. T., J. Chromatogr., **47**, 232 (1970).
56. Parihar D. B., Sharma S. P., Verma K. K., J. Chromatogr., **26**, 292 (1967).
57. Chapman D. I., Chapman J. R., Clark J., Int. J. Biochem., **3**, 66 (1972).
58. Thielemann H., Pharmazie, **24**, 703 (1969).
59. Geissbuehler H., Gross D., J. Chromatogr., **27**, 296 (1967).
60. Barney J. E., II, Harvey S. R., Hermann T. S., J. Chromatogr., **45**, 82 (1969).
61. Jones G. R. N., J. Chromatogr., **77**, 357 (1973).
62. Ratney R. S., J. Chromatogr., **26**, 299 (1967).
63. Stewart J. T., Sternson L. A., J. Chromatogr., **92**, 182 (1974).
64. Мустрюков Е. А., Хроматография, **9**, 374 (1962).
65. Brockmann H., Schodder H., Chem. Ber., **74**, 73 (1941).
66. Petrowitz H.-J., Mitt. Deut. Ges. Holzforsch., **48**, 57 (1961).
67. Petrowitz H.-J., Chem.—Ztg., **85**, 143 (1961).
68. Petrowitz H.-J., Pastuska G., Wagner S., Chem.-Ztg., **89**, 7 (1965).
69. Petrowitz H.-J., Materialpruefung, **2**, 309 (1960).
70. Janak J., J. Chromatogr., **15**, 15 (1964).
71. Janak J., Nature, **195**, 696 (1962).
72. Peuryjoy P. V., Slaymaker S. G., Nager M., Anal. Chem., **31**, 1740 (1959).

73. Bender D. F., Sawacki E., Wilson R. M., Jr., *Air Water Pollut.*, **8**, 633 (1964).
74. Bender D. F., Sawacki E., Wilson R. M., Jr., *Anal. Chem.*, **36**, 1011 (1964).
75. Sawicki E., Stanley T. W., Johnson H., *Microchem. J.*, **8**, 257 (1964).
76. Sawicki E., Stanley T. W., Pfaff J. D., Elbert W. C., *Anal. Chim. Acta*, **31**, 359 (1964).
77. Sawicki E., Elbert W. C., Stanley T. W., *J. Chromatogr.*, **17**, 120 (1965).
78. Sawicki E., Stanley T. W., Elbert W. C., *J. Chromatogr.*, **18**, 512 (1965).
79. Prost M., Urbain M., Charlier R., *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1134 (1969).
80. Roomi M. W., *J. Chromatogr.*, **65**, 580 (1972).
81. Binns F., Chapman R. F., Robson N. C., Swan G. A., Waggott A., *J. Chem. Soc. C*, **1970**, 1128.
82. Kiessling M., Lauckner J., Braeuer S., Fuerst H., *Chem. Tech. (Berlin)*, **19**, 364 (1967), through *Anal. Abstr.*, **15**, 5408 (1968).
83. Stefanescu D., Moraru D., Predescu I., Barza P., Stanciu T., Coman F., *Farmacia (Bucharest)*, **17**, 115 (1969); through *Chem. Abstr.*, **71**, 30331s (1969).
84. Di Bello C., Galiazzo G., *J. Chromatogr.*, **26**, 309 (1967).
- 84a. Tabak S., Machado Verzola M. R., *J. Chromatogr.*, **51**, 334 (1970).
85. Катвалян Г. Т., Мистрюков Е. А., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1969**, 1809.
86. Kido R., Noguchi T., Tsuji T., Kaseda H., Matsumura Y., *Wakayama Med. Rep.*, **11**, 115 (1966); through *Anal. Abstr.*, **15**, 1548 (1968).
87. Troszkiewicz C., Suwiński J., Zieliński W., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **13**, 3 (1968).
88. Peyre J. P., Reynier M., *Ann. Pharm. Fr.*, **27**, 749 (1969).
89. Guven K. C., Tekinalp B., *Eczacilik Bul.*, **10**, 26 (1968); through *Anal. Abstr.*, **16**, 3218 (1969).
90. Guven K. C., *Eczacilik Bul.*, **6**, 117 (1964); through *Chem. Abstr.*, **62**, 12981h (1965).
91. Якушович В. Г., Кутаев Ю. П., Тугова З. С., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, 2086.
92. Giao D. H., Verdier A., Lattes A., *J. Chromatogr.*, **41**, 107 (1969).
93. Westley J. W., Close V. A., Nitecki D. N., Halpern B., *Anal. Chem.*, **40**, 1888 (1968).
94. Simmons W. S., DeAngelis R. L., *Anal. Chem.*, **45**, 1538 (1973).
95. De Silva J. A. F., Munno N., Strojny N., *J. Pharm. Sci.*, **59**, 201 (1970).
96. Cole E. R., Crank G., Sheikh A.-S., *J. Chromatogr.*, **78**, 323 (1973).
97. Goenechea S., *J. Chromatogr.*, **36**, 375 (1968).
98. Zielinska E., *Chem. Anal. (Warsaw)*, **14**, 397 (1969).
99. Waksmundzki A., Rozylo J. K., Scislowicz A., *J. Chromatogr.*, **46**, 204 (1970).
100. De Silva J. A. F., Strojny N., Stika K., *Anal. Chem.*, **48**, 144 (1976).
101. Dutta J., Hoque M., Chakraborty D. P., *J. Chromatogr.*, **42**, 555 (1969).
102. Klemm L. H., Klopfenstein C. E., Kelly H. P., *J. Chromatogr.*, **23**, 428 (1966).
103. Kapisinšká V., Karvaš M., *Chem. Prum.*, **21**, 129 (1971).
104. Wu F. Y.-H., McCormick D., *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 479 (1971).
105. Hansen I. L., Crawford M. A., *J. Chromatogr.*, **22**, 330 (1966).
106. Agathopoulos A. S., *Chim. Chron.*, **30**, 213 (1965).
107. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H., Zagórski Z., *J. Chromatogr.*, **17**, 288 (1965).
108. Mahon M. E., Mattok G. L., *Anal. Biochem.*, **19**, 180 (1967).
109. Schlossberger H. G., Kuch H., Buhrow I., *Z. Physiol. Chem.*, **333**, 152 (1968).
110. Raj R. K., Hutzinger O., *Anal. Biochem.*, **33**, 471 (1970).
111. Wang K. T., Tung Y. C., Lai H. H., *Nature*, **213**, 213 (1967).

112. Freimuth U., Buechner M., Zawta B., Hubl W., Keibel D., *Dtsch. Gesundheitswes.*, **21**, 2039 (1966).
113. Hornemann U., Floss H. G., *Anal. Biochem.*, **26**, 469 (1968).
114. Sági F., *J. Chromatogr.*, **39**, 334 (1969).
115. Young D. S., *Clin. Chem.*, **16**, 681 (1970).
116. Glombitza K.-W., *J. Chromatogr.*, **25**, 87 (1966).
117. Niederwieser A., Giliberti P., *J. Chromatogr.*, **61**, 95 (1971).
- 117a. Johri B. N., *J. Chromatogr.*, **50**, 340 (1970).
118. Stahl E., Kaldewey H., *Z. Physiol. Chem.*, **323**, 182 (1961).
119. Ballin G., *J. Chromatogr.*, **16**, 152 (1964).
120. Bird R. F., Stevens S. G. E., *Analyst (London)*, **87**, 362 (1962).
121. Preussmann R., Daiber D., Hengy H., *Nature*, **201**, 502 (1964).
122. Eisenbrand G., Spaczynski K., Preussmann R., *J. Chromatogr.*, **51**, 503 (1970).
123. Vasundhara T. S., Jayaraman S., Parihar D. B., *J. Chromatogr.*, **115**, 535 (1975).
124. Sen N. P., Dalpe C., *Analyst (London)*, **97**, 216 (1972).
125. Bayzer H., *Experientia*, **20**, 233 (1964).
126. Waldi D., *Naturwissenschaften*, **50**, 614 (1963).
127. Newhall W. F., Pierunger A. P., *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 488 (1967).
128. Bayzer H., *J. Chromatogr.*, **24**, 372 (1966).
129. Vernin G., Metzger J., *Chim. Anal. (Paris)*, **46**, 487 (1964).
130. Schmid E., Zicha L., Krautheim J., Blumberg J., *Med. Exp.*, **7**, 8 (1962).
131. Potter W. P., Vochten R. F., Schaepdryver A. F., *Experientia*, **21**, 482 (1965).
132. Schneider F. H., Gillis C. N., *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 623 (1965).
133. Meythaler C., Schmid E., Blumberg J., Zicha L., Witte S., *Med. Exp.*, **7**, 232 (1962).
134. Vahidi A., Sankar D. V., *J. Chromatogr.*, **43**, 135 (1969).
135. Waldi D., *Arch. Pharm.*, **295/32**, 125 (1962).
136. Forrest J. E., Heacock R. A., *J. Chromatogr.*, **44**, 638 (1969).
137. Dworzak E., Huck H., *J. Chromatogr.*, **61**, 162 (1971).
138. Huck H., Dworzak E., *J. Chromatogr.*, **74**, 303 (1972).
139. Johnson G. A., Boukma S. J., *Anal. Biochem.*, **18**, 143 (1967).
140. Baumann P., Scherer B., Kraemar W., Matussek N., *J. Chromatogr.*, **59**, 463 (1971).
141. Sapira J. D., *J. Chromatogr.*, **42**, 134 (1969).
142. Seiler N., Wiechmann M., *J. Chromatogr.*, **28**, 351 (1967).
143. Grasshof H., *J. Chromatogr.*, **20**, 165 (1965).
144. Lynes A., *J. Chromatogr.*, **23**, 316 (1966).
145. Hopkins S. M., Sheehan G., Lyman R. L., *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, 272 (1968).

АМИНОКИСЛОТЫ, БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

1. ПРЯМОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Одно из достоинств метода ТСХ — его быстрота. Анализ аминокислот этим методом требует значительно меньше времени, чем хроматографирование на бумаге. Так, двумерное хроматографирование на бумаге длится несколько дней, тогда как методом ТСХ его можно осуществить за 4—5 ч. Другое преимущество ТСХ — повышенная чувствительность. Например, чувствительность определения гистамина этим методом в 2 раза выше, а чувствительность определения цистеиновой кислоты в 50 раз выше [24]. При двумерном разделении различие в чувствительности еще больше и для отдельных кислот может возрастать в 250—500 раз.

Нидервизер [1] обобщил работы по ТСХ аминокислот и их производных, а Патаки [2] опубликовал книгу, посвященную методике разделения аминокислот и пептидов.

Аминокислоты разделяют на тонких слоях крахмала, целлюлозы, ацелированной целлюлозы, оксидов алюминия и кальция, гидроксида железа, активного угля, гидроксида кальция, фосфата кальция, сульфата кальция, оксида магния, трисиликата магния, альгиновой кислоты, полиакрилонитрила, полиамида, сефадекса, кизельгура, анионо- и катионообменниках и силикагеле. Чаще всего применяют силикагель и целлюлозу.

Обессоливание проб

Перед хроматографическим разделением природных аминокислот, чтобы предотвратить размывание задней границы пятен и ее деформацию, иногда приходится удалять мешающие анализу вещества. Это в особенности относится к пробам мочи и гидролизатов белков или пептидов, содержащих большие количества солей. В настоящее время разработан и опробован ряд методов обессоливания: а) электрофорез [3—5]; б) обработка ионообменными смолами [6—11], сефадексом [12—14], нейтральными полистирольными смолами (поропак Q) [15—16], ионоудерживающими смолами [17, 18] и в) экстракция растворителями [19, 20]. Хискот и др. [18] сравнили степень извлечения аминокислот из ионоудерживающих смол био-рад AG 11A8

с аналогичными показателями, получаемыми при электрофорезе, экстракции растворителями и обработке ионообменными смолами, и обнаружили, что самое лучшее извлечение обеспечивают ионоудерживающие смолы. Эти смолы, однако, непригодны для извлечения цитратов и ацетатов [17], а также для обессоливания образцов почв и гидролизатов горных пород [21]. Чтобы удалить из образцов почв ионы Al, Ca, Mg, Na, Fe и K, Поллок и Миямото [21] обрабатывали пробы последовательно HF, NaOH и HCl, а в заключение проводили разделение аминокислот на колонке с ионообменной смолой дауэкс AG 50W-X8 (H⁺-форма).

Томпсон и др. [22] достигали хорошего извлечения на ионообменных смолах при температуре от 0 до 6 °С. Основные аминокислоты удерживаются NH₄⁺-формой дауэкса 50-X4, другие аминокислоты — H⁺-формой этой смолы. Для успешного применения этого метода смолы необходимо соответственно приготовить.

Джекобсон [22a] рекомендует сэндвичевый диализ с использованием полиакриламида, крахмала или агарового геля. Небольшой кусок целлюлозы или стеклянной фильтровальной бумаги пропитывают исследуемой пробой и зажимают между двумя слоями 5 %-ного геля полиакриламида (толщина 3 мм). Белки молекулярной массы 50 000 и выше практически не диффундируют в гель; соли и молекулы меньшего размера диффундируют в гель, который, если концентрация соли высока, можно заменить через несколько минут. Через 15 мин пробу можно нанести в исходную точку. Для белков меньшей молекулярной массы рекомендуют применять 10—20 %-ный гель.

О концентрировании разбавленных растворов белков см. во введении к гл. IV.

Разделение на силикагеле

Бреннер и Нидервизер [23], а также Фэми и др. [24] провели обширное исследование разделения аминокислот на силикагеле G; они получили величины R_f для 26 соединений в различных растворителях (табл. 17.1). Разделение осуществляли на воздушно-сухих пластинках силикагеля в насыщенной атмосфере. Трудноразделимые пары соединений удалось эффективно разделить методом двумерного хроматографирования с различными растворителями. После 10-минутной сушки хроматограмм при 110 °С авторы обнаружили пятна аминокислот реактивом Т-178. Получаемая при этом окраска пятен характерна для индивидуальных аминокислот. Длина пути разделения в этом случае составляет 10 см. Бенчер и др. [25] описали методику хроматографирования на пластинках меньших размеров при длине пути

Таблица 17.1

Величины $R_f \times 100$ аминокислот, полученные для различных растворителей на силикагеле G

Аминокислота	Растворители ^а							
	А ^б	Б ^б	В ^б	Г ^б	Д ^б	Е ^б	Ж ^б	В ^б
α -Аланин	47	37	27	39	40	49	25	32
β -Аланин	33	26	27	30	29	49	20	33
α -Аминомасляная кислота						54	25	32
β -Аминомасляная кислота						48	32	36
γ -Аминомасляная кислота						38	30	39
α -Аминоизомасляная кислота						57	26	35
β -Аминоизомасляная кислота						46	29	38
α -Аминкаприловая кислота	66	65	60	58	60			
Аргинин	4	2	8	10	6	6	14	13
Аспарагин						46	19	22
Аспарагиновая кислота	55	33	21	9	7	56	5	26
Цитруллин						46	29	26
Цистеиновая кислота	69	50	14	17	21	61	5	20
Цистин	39	32	16	27	22	8	9	7
Диоксифенилаланин			45					
Глутаминовая кислота	63	35	27	14	15	55	7	32
Глутамин						55	28	24
Глицин	43	32	22	29	34	50	18	28
Гистидин	33	20	6	38	42	33	24	10
Оксипролин	44	34	20	28	31	63	33	26
Изолейцин	60	53	46	52	58	60	36	47
Лейцин	61	55	47	53	58	63	37	53
Лизин	3	2	5	18	11	5	8	10
Метионин	59	51	40	51	60	62	36	43
Норлейцин	61	57	49	53	59	66	54	55
Норвалин	56	50	38	49	57	67	56	54
Орнитин						6	5	8

Продолжение табл. 17.1

Аминокислота	Растворители ^а							
	А ^б	Б ^б	В ^б	Г ^б	Д ^б	Е ^б	Ж ^б	В ^б
Фенилаланин	63	58	49	54	60	63	41	54
Пролин	35	26	19	37	30	48	45	24
Саркозин	31	22	17	34	31			
Серин	48	35	22	27	31	52	19	29
Таурин						59	22	29
Треонин	50	37	25	37	40	66	18	28
Триптофан	65	62	56	55	58	69	45	56
Тирозин	65	62	56	55	58	65	36	50
Валин	55	45	35	48	56	56	29	38

^а А — 96 %-ный этанол—вода (7:3); Б — *n*-пропанол—вода (7:3); В — *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1); Г — *n*-пропанол—34 %-ный гидроксид аммония (7:3); Д — 96 %-ный этанол—34 %-ный гидроксид аммония (7:3); Е — *n*-пропанол—вода (1:1); Ж — фенол—вода (3:1). Длина пути разделения 10 см во всех растворителях.

^б Данные работы [23].

^в Данные работы [34].

разделения 6 см. Они привели также значения R_f 16 аминокислот, полученные для 5 растворителей и смеси силикагеля и кизельгура (4:11 и 1:1).

Для разделения аминокислот на силикагеле используется большое число систем растворителей, часть из них приведена в табл. 17.2.

Патаки [33] исследовал разделение нескольких аминокислот на пяти различных силикагелях и обнаружил, что при одинаковых условиях некоторые гели обеспечивают лучшее разделение одних групп кислот и худшее других групп; следовательно, для достижения оптимальных результатов следует подбирать не только растворитель, но и сорт силикагеля.

Изучая методом Бреннера и др. [23] аминокислоты мочи, Опиенска-Блаут и др. [34] определили величины R_f для 33 аминокислот в трех растворителях (табл. 17.1). Кроме указанных в таблице растворителей эти авторы опробовали большое число специальных растворителей. Разделение групп лейцина и валина проводилось смесью фенол—*m*-крезол—боратный буфер при pH 9,3 (1:1:1). Для основных аминокислот использовалась смесь ацетон—пиридин—*n*-бутанол—вода—диэтиламин

Таблица 17.2

Некоторые дополнительные растворители для хроматографического разделения аминокислот на силикагеле

Система растворителей	Литература
Этилацетат—изопропанол—вода—аммиак (20 : 20 : 25 : 1 : 5)	26
Ацетон—вода—уксусная кислота—муравьиная кислота (50 : 15 : 12 : 3)	26
Фенол—вода—уксусная кислота (25 : 25 : 2,5)	26
Хлороформ—метанол—аммиак (30 : 30 : 7,5)	26
Этилацетат—пиридин—уксусная кислота—вода (30 : 20 : 6 : 11)	27
Толуол—уксусная кислота—вода (30 : 20 : 1) (проявляют дважды)	28
96 %-ный этанол—вода—диэтиламин (70 : 29 : 1)	29
Хлороформ—муравьиная кислота (20 : 1)	30
Хлороформ—метанол (9 : 1)	30
Изопропанол—вода (7 : 3)	31
Изопропанол—5 %-ный аммиак (7 : 3)	31
Фенол—0,06 М боратный буфер, pH 9,3 (9 : 1)	32

(15 : 9 : 15 : 8 : 10), а также пропанол—вода (7 : 3)—растворитель Бреннера—Нидервизера.

Карисано [35] разделил методом ТСХ смеси 3-метилгистидина, 1-метилгистидина и гистидина с тем, чтобы выявить китовый экстракт в суповых продуктах. Китовый экстракт содержит значительные количества β -аланил-3-метилгистидина вместе с карнозином (β -аланилгистидин), тогда как говяжий экстракт содержит карнозин и небольшие количества ансерина (β -аланил-1-метилгистидин) [36]. После гидролиза экстракта эти три соединения разделяли хроматографически на силикагеле G со смесью метанол—пиридин—вода—уксусная кислота (6 : 6 : 4 : 1). Величина R_{st} , отнесенная к гистидину, равна для 3-метилгистидина 0,84, а для метилгистидина 0,86. Для лучшего разделения, особенно когда при большом количестве гистидина наблюдается тенденция к размыванию задней границы и наложению на пятно 3-метилгистидина, можно воспользоваться методом двумерной ТСХ и хроматографировать в одном направлении смесью фенол—этанол—вода—аммиак (3 : 1 : 1 : 0,1), а во втором направлении—смесью метанол—пиридин—вода—уксусная кислота (6 : 6 : 4 : 1). Пятно 3-метилгистидина легко отличить от пятна 1-метилгистидина после обработки реактивом Т-178. После оп-

рыскивания пластинок их нагревают в печи 1,5—2 мин при 105 °С; за это время пятно 3-метилгистидина становится интенсивно сине-фиолетовым с желтоватым ореолом, а пятно 1-метилгистидина окрашивается в светло-желтый цвет с зеленоватым оттенком.

Рокконес [37] привел величины R_f 34 соединений, реагирующих с нингидрином, выделенных из мочи и разделенных на пластинках силикагеля. Этот автор вначале разделял пробы смесью хлороформ—метанол—17 %-ный гидроксид аммония (2 : 2 : 1), а затем смесью фенол—вода (3 : 1).

Эйлер и др. [38] сравнили аминокислоты в нормальной сыворотке и сыворотке опухоли крысы и обнаружили, что в последней в четыре раза больше глицина.

Скибб [39] разделил и количественно определил на слоях силикагеля аминокислоты, содержащиеся в образцах печени птиц. Для разделения этих аминокислот он использовал ступенчатое элюирование сначала смесью бутанол—уксусная кислота—вода (3 : 1 : 1), а затем в том же направлении 75 %-ным фенолом. Для количественного определения пятен, которые обнаруживали 0,25 %-ным раствором нингидрина в ацетоне, использовали метод прямой денситометрии при 525 нм. Скибб [40] наносил слои силикагеля на пластмассовые пластинки. После разделения и обнаружения пятен хроматограммы опрыскивают раствором полимера Tuffilm Spray 543 (M. Grumbacher), чтобы связать слой с подложкой. Далее хроматограммы разрезают на полоски для сканирования в стандартном устройстве.

Маркуччи и Муссини [41] анализировали хроматографически пролин, дегидропролин, некоторые оксипролины и соответствующие нитрозопроизводные на слоях силикагеля. Михил и Джексон [42] разделяли на слоях целлюлозы со смесью бутанол—уксусная кислота—вода (63 : 27 : 10) пролин и оксипролин, а также соответствующие нитрозопроизводные.

Фогт и др. [43] хроматографически разделили γ -аминомасляную кислоту и другие важные аминокислоты головного мозга на силикагеле и привели значения R_f для шести растворителей.

Существует ряд комбинаций растворителей, которые пригодны для двумерного разделения на силикагеле; ниже указаны некоторые из этих комбинаций, успешно сочетаемые с силикагелем: этилацетат—изопропанол—вода—аммиак (40 : 40 : 50 : 3) в одном направлении и ацетон—вода—уксусная кислота—муравьиная кислота (50 : 15 : 12 : 3) или хлороформ—метанол—аммиак (4 : 4 : 1) — в другом [26]; трет-амиловый спирт—метилэтилкетон—вода (6 : 2 : 2) и изопропанол—муравьиная кислота—вода (20 : 1 : 5) в перпендикулярном первому направлению [44]; бутанол—уксусная кислота—вода (4 : 1 : 1), после чего смесь

фенол—вода (3:1) (по массе), к которой добавлено 0,5 мл 5 %-ного раствора цианида натрия [45]; пропанол—вода (16:9) в одном направлении и бутанол—уксусная кислота—вода—в другом [46].

Шеллард и Жолифе [29] исследовали, как меняются величины R_f аминокислот экстракта пыльцы травы при хранении в 50 %-ном глицерине. Совокупность значений R_f в четырех растворителях позволяет идентифицировать индивидуальные аминокислоты даже при изменении их R_f .

Разделение на слоях целлюлозы

В работах [47—53] описано разделение аминокислот на тонких слоях целлюлозы. Обычно в этом случае вполне приемлемы растворители и реактивы для опрыскивания, применяемые в хроматографии на бумаге. Фон Аркс и Негер [54] разработали методику разделения и идентификации 52 аминокислот (табл. 17.3) на слоях целлюлозы с четырьмя смесями растворителей с применением пяти цветных реакций. С этой целью были приготовлены шесть пластинок размером 20×20 см, покрытых целлюлозой (все авторы использовали четыре цветные реакции при двумерной комбинации I и II). Пластины сушили 12 ч при комнатной температуре в горизонтальном положении и наносили водный раствор пробы в угол пластинки на расстоянии 25 мм от края. Объем пробы не должен превышать 1 мкл, а общее количество данной аминокислоты не должно превышать 10 мкг.

Все шесть пластинок элюировали смесью I в одном каком-либо направлении. (Атмосфера в камере для разделения не должна быть насыщена парами растворителей.) Раствор поднимался до верха пластинки, после чего слои сушили 5—10 мин при 90°C или 12 ч при комнатной температуре. Для элюирования во втором направлении использовали контрольную смесь (1 мкл), содержащую 0,5 мкг глицина, 1 мкг тирозина и 1 мкг норлейцина. Эту смесь наносили вместе с пробой на первую стартовую линию, после чего проводили элюирование под прямым углом к первому направлению. Четыре пластинки из шести обрабатывали смесью растворителей II, а оставшиеся две — смесями III и IV. После второго разделения пластинки сушили 20 мин при 90°C, после чего опрыскивали обнаруживающими растворами. Пять цветных реакций с реактивами T-177, T-153, T-249, T-205 и T-239 считаются стандартными.

Кроме растворителей, приведенных в табл. 17.3, в оригинальной работе указаны 24 другие смеси растворителей, которые использовали для разделения аминокислот на целлюлозе или силикагеле, и три смеси растворителей, применяемые только при разделении на силикагеле.

Хаворс и Хиткот [55, 56] разработали новую систему разделения и идентификации 76 аминокислот и других азотсодержащих метаболитов в биологических жидкостях. Разделения проводили методом двумерного элюирования; длина пути разделения на слоях целлюлозы MN 300 составляла 13 см. Целлюлозу предварительно очищали, как это описано в гл. III, разд. 2. Растворители представляли собой смеси пропанол-2—бутанол-1 н. соляная кислота (12:3:5) и 2-метилпропанол-2—бутанол-2—пропанол—метанол—вода—аммиак (уд. масса 0,88) (40:20:20:1:14:5). Позднее [56а] состав второй смеси был несколько изменен: 2-метилбутанол-2—бутанол—пропанол—метанол—вода—аммиак (уд. масса 0,88) (10:4:2:1:3:1). После первого разделения пластинки сушили 15 мин током холодного воздуха, а затем в конвекционной печи 15 мин при 60°C, чтобы полностью удалить следы соляной кислоты. Разделение осуществляли в камере с насыщенной атмосферой. Насыщения достигали, сохраняя в резервуаре растворитель, оставшийся от опытов предыдущего дня [57]; перед опытом старый растворитель заменяли новым. Идентификацию завершали, применяя один или несколько окрашивающих реагентов; описано 12 таких реагентов. Величины R_f и многочисленные цветные реакции приведены в оригинальных статьях.

Некоторые из растворителей, используемых для разделения аминокислот на целлюлозе, приведены в табл. 17.4. К числу растворителей, которыми проводят двумерное разделение, относятся: *n*-бутанол—пиридин—вода (1:1:1) и далее смесь 88 %-ный фенол—25 %-ный аммиак—вода (10:0,8:1), содержащая 1 мг оксихинолина на 200 мл [58]; изопропанол—муравьиная кислота—вода (20:1:5) и *трет*-бутанол—бутанол-2—0,9 н. аммиак—вода (25:15:7:3) [59]. Разделение в обоих направлениях осуществляют в резервуаре с ненасыщенной атмосферой. В камере с ненасыщенной атмосферой проводят также разделение смесью *n*-пропанол—вода (7:3) на расстоянии 12 см, затем под прямым углом на расстоянии 10 см элюируют пробу смесью изопропанол—вода (4:1), после чего повторяют разделение в первом направлении с первым растворителем [60, 61]. После разделения смесью метанол—хлороформ—аммиак (2:2:1) в первом направлении обычно проводят элюирование смесью метанол—вода—пиридин (20:5:1) в перпендикулярном направлении; однако при разделении лейцина и изолейцина элюировать в первом направлении следует смесью *трет*-амиловый спирт—метилэтилкетон—вода (6:2:2) [62].

Аминокислоты при разделении методом ТСХ в присутствии трихлоруксусной кислоты, применяемой при депротонизации проб сыворотки, обнаруживают аномальное поведение. Такие помехи можно почти полностью устранить, осуществляя

Двумерное разделение аминокислот на слоях целлюлозы. Величины $R_f \times 100$ и цветные реакции [54] а, б

	Растворители б, в				мкг. г	Реактивы для обнаружения ^а				
	I	II	III	IV		НК	ИЗ	ДП	РХ	НПК
Гликоциамин	0—7	34	8	71		Розовая			(+)	+
Аргинин	3—8	13	2	90	0,2	Фиолетовая			+	+
Креатин	2—9	34	8	86	2,0	Желтая		(+)	+	+
α, α -Диаминопимелиновая кислота	2—10	5	6	36		Красная			Серая	
Аспарагиновая кислота	8—14	21	20	20	0,05	Фиолетовая			(+)	
Лантионин	9—17	8	22	35	1,0	Фиолетовая			Розовая	
Канаваинсульфат	12—17	7	11	66	0,2	Коричневая			+	+
Диоксифенилаланин	10—22	16	10	13	10,0	Серая		+	(Желтая)	
Глутамовая кислота	15—20	30	21	25	0,05	Фиолетовая				
Оксиглутамовая кислота	16—21	30	15	25	0,05	Розовая			+	
Цистин	17—22	4	26	35	1,0	Коричневая			(Желтая)	
Цитруллин	19—24	16	15	68	0,1	Фиолетовая			+	
Аспарагин	19—25	12	21	47	2,0	Желтая			+	
Цистеиновая кислота	23—27	6	41	9	0,05	Фиолетовая			(+)	
Метилонисульфоксид	24—28	19	26	82	0,2	Розовая			(Коричневая)	
Глутамин	25—29	14	18	59	0,5	Розовая			(+)	
<i>l</i> -Аминогиппуровая кислота	44—49	65	74	89	10,0	Фиолетовая			+	
Тирозин	45—51	38	56	71	0,5	Коричневая			(Розовая)	
Таурин	46—52	21	44	51	0,2	Фиолетовая			+	
Валин	49—55	55	44	87	0,05	Розовая			(+)	
ϵ -Амино- <i>n</i> -капроновая кислота	52—57	55	20	87	1,0	Розовая			+	
Норвалин	52—58	55	45	87	0,05	Красная			(+)	
Кинуренин	54—60	39	47	80	0,5	Коричневая			(Желтая)	
Аллотреонин	54—60	31	55	59	0,5	Фиолетовая			(+)	
Триптофан	56—62	41	60	88	0,5	Лиловая			(Коричневая)	
Метионин	56—62	50	54	88	0,5	Розовая			(+)	
Изолейцин	58—64	65	62	88	0,1	Розовая			(+)	
Аллоизолейцин	58—64	65	62	88	0,1	Розовая			(+)	
Лейцин	59—66	65	60	88	0,5	Розовая			(+)	
Норлейцин	59—66	65	60	88	0,5	Лиловая			(+)	
Треонин	60—67	31	67	56	0,5	Розовая			(+)	
α -Фенилаланин	61—67	54	73	88	0,2	Лиловая			Желтая	

	Растворители б, в				мкл, г	Реактивы для обнаружения 1				
	I	II	III	IV		НК	ИЗ	ДП	РХ	НПК
Диодтеразин	62—69	50	73	71	5,0	Фиолетовая	Лиловая	(+)	+	
Тирозин	63—69	62	82	88	2,0	Коричневая	Коричневая			
α -Фенилглицин	63—69	76	81	77	5,0	Желтая	Желтая	(+)	(Коричневая)	
β -Оксивалин	62—69	41	81	65	0,5	Фиолетовая	Розовая		(+)	
Тироксин	69—76	73	84	86	2,0	Коричневая	Желтая		(+)	
Оксипролин	26—30	22	19	66	1,0	Желтая	Синяя		(+)	
Глицин	28—33	22	19	46	0,05	Коричневая	Розовая		+	
Орнитин	28—33	8	5	82	0,2	Фиолетовая	Красная		+	
Оксализин	29—34	8	11	71	0,5	"	Лиловая		+	
Лизин	32—37	10	6	82	0,5	"	Красная		+	
α -Аланин	33—38	34	22	61	0,05	"	Фиолетовая		+	
β -Аланин	33—39	37	14	66	0,05	Зеленая	Лиловая		+	
Креатинин	33—39	36	25	97			Желтая		+	+
Саркозин	36—41	29	17	80	0,1	Серая	"		+	
α , γ -Диаминомасляная кислота	36—42	8	20	73	2,0	Фиолетовая	Розовая		+	
Гистидин	36—41	11	34	87	0,3	Серая	Лиловая	+	(Серая)	
Метионинсульфон	37—42	20	36	73	0,2	Фиолетовая	Розовая		(+)	
Диметилцистен	40—45	10	53	73	0,2	"	"		—	
Пролин	41—46	35	19	87	0,5	Желтая	Синяя		(+)	
α -Аминомасляная кислота	41—46	43	21	87	0,05	Лиловая	Желтая		+	
α -Аминозomásляная кислота	41—47	50	25	78	0,05	Фиолетовая	Лиловая		+	
α -Амино- <i>n</i> -масляная кислота	42—47	42	31	78	0,05	"	"		(+)	
γ -Аминомасляная кислота	42—48	46	13	78	0,2	"	"		+	
β -Аминомасляная кислота	42—48	47	22	78	0,05	"	"		+	
Серин	42—49	21	38	41	0,2	"	Оранжевая		Желтая	

а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

б Во всех системах атмосфера камеры не насыщена парами растворителя. Длина пути разделения 16 см.

в Колонка I. Примерная область значений $R_f \times 100$ после разделения в одном направлении в первом растворителе; колонки II, III, IV: $R_f \times 100$ после разделения в другом направлении в соответствующем растворителе. Растворители: I — *n*-бутанол—ацетон—диэтиламин—вода (10:10:2:5); II — изопропанол—муравьиная кислота—вода (20:1:5); III — втор-бутанол—метилэтилкетон—дицилотексилламин—вода (10:10:2:5); IV — фенол—вода (75:25) + 7,5 мг цианида натрия. Атмосфера в этом случае находится в равновесии с парами 3%-ного гидроксида аммония.

г мкг в практической области детектирования для реакции нингидрина в двумерной хроматографии при использовании комбинации I и II. Фактический предел детектирования ниже и до некоторой степени зависит от условий высушивания после нанесения нингидринового реактива.

д Реактивы для обнаружения (о приготовлении см. в тексте). Цветная реакция, кроме реакции с НК, свидетельствует о наличии от 0,5 до 5 мкг аминокислоты. (+) означает слабую цветную реакцию. НК — нингидрин-коллидиновый реактив; ИЗ — изотин; ПД — диазореагент Паули; + означает желтого-красную окраску; РХ — усовершенствованный реактив Райделя—Хоппе; + означает синевато-черную окраску, ИПК — реактив нитропруссидна натрия с феррицианидом калия, + означает красную окраску.

Таблица 17.4

Некоторые дополнительные растворители для хроматографического разделения аминокислот на целлюлозе

Система растворителей	Литература
Этилацетат—пиридин—уксусная кислота—вода (5:5:1:3)	51
<i>n</i> -Бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1; 10:3:9)	
<i>n</i> -Бутанол—уксусная кислота—вода—этанол (10:1:3:0,3; 4:1:10:1)	52
<i>втор</i> -Бутанол—диметилкетон—уксусная кислота—вода (10:10:2:5)	53
<i>n</i> -Бутанол—диметилкетон—аммиак—вода (20:20:4:1)	
Фенол—метанол—вода (7:10:3)	
Коллидин— <i>n</i> -бутанол—ацетон—вода (2:10:10:5)	
Коллидин—метанол—ацетон—вода (2:10:10:5)	
<i>n</i> -Пропанол—вода (4:1)	
Этанол—уксусная кислота—вода (2:1:2)	
Циклогексанол—ацетон—диэтиламин—вода (10:5:2:5)	53а
<i>трет</i> -Бутанол—уксусная кислота—вода (5:1:1)	

предварительное двукратное элюирование эфиром, насыщенным муравьиной кислотой [63].

Уиланд и Буку [63а] разработали микрометод для определения конфигурации аминокислоты путем хроматографического разделения полученных из этой кислоты LL- или LD-дипептидов.

Разделение на смешанных адсорбентах

Ллоза и др. [64] исследовали разделение 19 аминокислот на диэтиламиноэтилцеллюлозе с 9 различными смесями растворителей. Они свели в таблицу величины R_f и цветные реакции с нингидрином. Лепри и др. [65] провели хроматографический анализ 17 ароматических аминокислот на DEAE-целлюлозе (целлекс D, ClO₄, Bio-Rad Labs.), используя в качестве растворителя 0,1 М раствор перхлората натрия. Феркаемст и др. [66] провели на слоях DEAE-целлюлозы тройное разделение 18 аминокислот в одном направлении смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). Двумерные разделения осуществляли, применяя два элюирования в одном направлении тем же растворителем и смесью пиридин—вода (4:1) в направлении, перпендикулярном первому. Этим методом хорошо разделяются та-

кие пары, как глутаминовая кислота—глицин и аспарагиновая кислота—серин.

В ряде работ рассматривается возможность использования в ТСХ других ионообменных смол. Тийяк и др. [67] и Хазан и др. [68] наносили слои смолы типа дауэкс 50-X8 на имеющиеся в продаже пластинки Fixion 50-X8. Для Na⁺-формы смолы и различных буферных растворителей удалось определить величины R_f 30 аминокислот [67], для H⁺-формы смолы и подкисленных растворителей определены 15 величин R_f [68]. В работе [65] описано разделение ароматических аминокислот на ионообменной смоле AG 1-X4 (ClO₄) и дауэкс 50-X4 (H⁺- и Na⁺-формы). Авторы работы [69] применяли в качестве ионообменника альгеновую кислоту для разделения 31 аминокислоты.

Дикарбоновые аминокислоты разделяли на оксиде алюминия, элюируя пробу 2 н. уксусной кислотой [70]. Монокарбоновые кислоты при этом не разделяются и концентрируются во фронте растворителя.

Аффонсо [70] разделил 12 аминокислот на слоях сульфата кальция (алебастр), используя смесь ацетон—хлороформ—уксусная кислота—ацетатный буфер, pH 4 (4:1:0,5:1,5). В обнаруживающий раствор непосредственно добавляли нингидрин; величина R_f при этом не менялась.

Петрович и Петрович [72] разделяли 22 аминокислоты на слоях рисового крахмала, содержавших в качестве связующего гипс. В первом направлении разделение проводили смесью *n*-бутанол—ацетон—диэтиламин—вода (10:10:2:5), а в другом направлении—смесью фенол—вода (3:1) в присутствии паров аммиака, изопропанол—вода—муравьиная кислота (20:5:1), изопропанол—вода—уксусная кислота—пиридин (25:20:5:2) и *n*-бутанол—уксусная кислота—вода—пиридин (20:5:25:1). Разделение на смешанных слоях проходило медленнее, чем на целлюлозе или силикагеле, но все же быстрее, чем на бумаге. Чувствительность определения с нингидрином—лутидином была хорошей при величине пробы порядка 0,1 мкг (0,5 мкг для аспарагина); при двумерном разделении рекомендуется наносить не менее 0,5 мкг каждой из кислот. Кукурузный крахмал оказался непригодным.

Хорошие результаты получены при использовании смеси (5:2) целлюлозы с силикагелем [73—75]. Двумерное разделение проводили следующим образом. Сначала пробу элюируют смесью фенол—вода (4:1, масса/объем), далее пластинку сушат ~12 ч при 40°C, после чего элюируют дважды во втором направлении смесями бутанол—уксусная кислота—вода (5:1:4, верхняя фаза) [73], или *втор*-бутанол—80%-ная муравьиная кислота—вода (15:3:2) и *n*-пропанол—34%-ный аммиак (67:33) [74], или изопропанол—муравьиная кислота—вода

(20:1:5) и *трет*-бутанол—этилацетат—аммиак (0,88)—вода (5:3:1:1) [75]. Смешанные слои обеспечивают лучшие результаты, чем индивидуальные адсорбенты. Проверенные на 27 кислотах [73] пятна в случае смешанных слоев были более компактными и хорошо разделенными, а чувствительность к нингидрину была в 2 раза выше, чем на целлюлозе, и в 5 раз выше, чем на силикагеле. Другие соединения, находившиеся в сырых экстрактах и пробах мочи, не мешали разделению. Кроме того, смешанные слои прочнее слоев чистого силикагеля G.

Разделение иодаминокислот

Цаппи [76] составлен обзор работ по разделению иодаминокислот методом ТСХ.

Шорн и Винклер [77] разделили хроматографически следующие иодаминокислоты: 3-моноидтирозин, 3,5-диидтирозин, 3,5-диидтиронин, 3,3',5-триидтиронин и тироксин. Хроматографирование велось на высушенных на воздухе в течение 12 ч слоях силикагеля с 50 различными системами растворителей. Элюент *n*-бутанол—ацетон—1 н. гидроксид аммония (1:4:1) обеспечивает хорошее разделение моно- и диидтирозина и приемлемое разделение 3,3',5-триидтиронина, тироксина и иодид-иона. Лучшего разделения последних трех соединений удается добиться при элюировании смесью ацетон—метил-*n*-оксисбензоат—1 н. гидроксид аммония (16:1:3). При двумерном хроматографировании достигается прекрасное разделение всех перечисленных соединений. Количественное определение проводят со сцинтилляционным счетчиком. Шнайдер и Шнайдер [78] исследовали смеси уксусная кислота—бензол—ксилол на слоях силикагеля, высушенных при 105°C, и установили, что лучшее разделение обеспечивается при соотношении компонентов 6:2:2. Были испытаны также щелочные растворители, и в этом случае лучшее разделение было достигнуто со смесью фенол—ацетон—1 н. гидроксид натрия (2:7:1) в атмосфере аммиака. Кислотные растворители разделяют диидтирозин и диидтиронин; основные растворители лучше разделяют диидтиронин и триидтиронин. Для обнаружения авторы [78] использовали реактив Мандла и Блокка [79], состоящий из смеси сульфата цезия и арсенита. Шталь и Пфайфл [80] также разделяли эти соединения на слоях силикагеля, содержащих крахмал в качестве связующего. Обнаружение эти авторы проводили, опрыскивая сухую хроматограмму 50 %-ной уксусной кислотой, облучая ее 10 мин коротковолновым УФ-светом и вновь опрыскивая 10 %-ной уксусной кислотой. Иод, выделяющийся в результате фотохимической реакции, дает на хроматограмме характерное синее пятно. Бергер и др. [81] применяли сложные слои для разделе-

ния смеси иодид-иона, тироксина, диидтирозина и моноидтирозина. Сложные слои состояли из узкой полоски, покрытой хлоридом серебра, и полосы, покрытой аннионообменной смолой дауэкс 1×2 (ОН⁻). Пробы наносили на слой хлорида серебра. При элюировании 3 н. раствором гидроксида калия в метаноле иодид-ион оставался в исходной точке, тироксин увлекался к границе двух слоев, а моно- и диидтирозиновые разделялись на ионообменном слое. Масаглия и Роза [82] достигли такого же результата, используя слои силикагеля и применяя смесь бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). Тирозин обнаруживали нингидрином, а другие радиоактивные соединения детектировали счетчиком Гейгера—Мюллера.

Липиды, содержащиеся в метанольных экстрактах биологических материалов, мешают разделению тиреоидных гормонов. Чтобы избежать мешающего влияния липидов, Цаппи и др. [83] наносили пробы на слои целлюлозы на равном расстоянии от боковых сторон пластинки и на расстоянии в 4 см от одного из краев. С противоположного края пластины элюирование вели хлороформом. Когда хлороформ достигал пробы у верхнего края, он растворял липиды и смещал их вверх, тогда как аминокислоты оставались в местах нанесения проб. Липидные примеси соскребали со слоя и проводили элюирование с этого же края смесью ацетон—0,1 н. уксусная кислота (1:4).

Холлингсфорд и др. [84] разделили на тонких слоях целлюлозы следующие иодаминокислоты: 3-моноид-*L*-тирозин, 3,5-диид-*L*-тирозин, 3,5-диид-*L*-тиронин, 3',3,5-триид-*L*-тиронин и *L*-тироксин, а также *L*-тирозин. Хорошего разделения удалось достичь со смесью *трет*-бутанол—2 н. гидроксид аммония—хлороформ; при этом не удалось разделить только 3,5-диид-*L*-тиронин и 3',3,5-триид-*L*-тиронин. Паттерсон и Клементс [85] применяли хроматографию на полосках бумаги, а также на целлюлозных пластинках, скрепленных крахмалом, для идентификации тироксина в добавках к кормам. Обнаружение проводили реактивом Т-122.

Оиллет и Балциус [86] разделяли 5-моноидтирозин, 3,5-диидтирозин, 3,3',5-триид-*L*-тиронин и 3,3',5,5'-тетраидтиронин на смеси целлюлозы MN 300 и силикагеля G (4:1). Лучшими растворителями оказались *трет*-амиловый спирт—диоксан—1 н. аммиак (2:2:1) и этанол—метилэтилкетон—2 н. аммиак (1:4:1).

Хамада и Ингбар [87] использовали электрофорез на слоях адсорбента Pevicon C-870 (Merck) для разделения тироксина и 3,3',5-триид-*L*-тиронина в свободном виде или в нормальной сыворотке.

Разделение методом электрофореза

Хонеггер [88] продемонстрировал разделение аминокислот методом электрофореза на тонких слоях силикагеля G, кизельгура G и оксида алюминия, приготовленного на буферном растворе цитрата натрия (0,1 М, рН 3,8). Напряжение составляло 460 В при токе 12,6 мА; электролитом служила смесь 2 н. уксусной и 0,6 н. муравьиной кислот (1 : 1). (Методика такого способа разделения рассматривается в гл. V, разд. 5.) Описана также комбинированная методика разделения, сочетающая электрофорез и хроматографирование: вначале в одном направлении проводят электрофорез, затем пластинку высушивают и осуществляют хроматографическое разделение в другом направлении. Найбом [42] описал методику анализа аминокислот комбинированным способом, сочетающим электрофорез и хроматографирование.

Билески и Тернер [89] использовали смешанный слой целлюлозы и силикагеля (12,5 : 5 или 5 : 2) для разделения двумерным методом электрофорез — ТСХ. Экстракт растительной ткани наносили вблизи одного из углов пластинки в виде полосы в 2,5 см. После этого опрыскивали слой буфером рН 2,0 (17 мл 90 %-ной муравьиной кислоты + 57 мл уксусной кислоты в 1 л), смачивая исходный край в последнюю очередь. После того как избыток буферного раствора стекал по каплям, слой соединили тампонами с электродными камерами и проводили электрофорез при 12—18°C в течение 20 мин при 1000 В (55 В/см) и 20—30 мА. Пластинку затем сушили 15 мин при 40°C в интенсивном потоке воздуха в атмосфере, освобожденной от аммиака. Пластинку погружали в воду под прямым углом к направлению электрофореза, следя за тем, чтобы вода покрывала всю пластинку, но не доходила на 1 см до края электрофоретических полос. Через 5 мин поднимающаяся вода перемещает полосы в компактно расположенные пятна у края пластинки. (При наличии в пробе аргинина или других основных аминокислот воду заменяют на 1 %-ную уксусную кислоту.) После сушки пластинку вновь элюируют, но уже в другом направлении смесью метилэтилкетон—пиридин—вода—уксусная кислота (70 : 15 : 15 : 2), чтобы разделить треонин и глутаминовую кислоту, а также удалить посторонние примеси. Второе разделение проводят смесью *n*-пропанол—вода—*n*-пропилацетат—уксусная кислота—пиридин (120 : 60 : 20 : 4 : 1).

Мунье и др. [89a] описали двумерное разделение на слоях целлюлозы (20×40 см). Хроматографирование вели смесью пиридин—этанол—вода (2 : 2 : 1) по более короткому пути, пока цветная метка (бриллиантовый черный VN) не достигала края

пластинки. После высушивания пластинку опрыскивали 0,025 М раствором тетрабората натрия. Электрофорез проводили под прямым углом к первому направлению в течение 3 ч при 410 В/см и обнаруживали реактивом Т-267. Разделение пептидов и входящих в них аминокислот методом ТСХ прекращали в тот момент, когда растворитель достигал края пластинки. В статье [89a] приводятся ссылки на более ранние работы в этой области.

Монтан и Туз-Суле [90] описали разделение аминокислот электрофорезом на тонком слое целлюлозы со смесью пиридин—уксусная кислота—водный буфер с рН 3,9. Пастушка и Тринкс [91] разделяли узкую группу аминокислот методом электрофореза на силикагеле G, пропитанном буферным раствором буры. Электролитом служила смесь 80 мл этанола и 30 мл дистиллированной воды, содержавшей 2 г кристаллического ацетата натрия. В качестве подложки при электрофорезе аминокислот использовали фосфорилированную целлюлозу [92] и сефадекс G25 [93].

2. РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Разделение производных аминокислот очень важно при определении строения пептидов. Для этой цели используют реакции белков и пептидов с 2,4-динитрофторбензолом, 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлоридом или фенилизотиоцианатом с последующим распадом до динитрофениламиноацетата, 1-диметиламинонафталинсульфониламинокислот (ДАНС- или ДНС-аминокислоты) и фенилтиогидантоинов соответственно. Методика приготовления этих производных описана в литературе (ДНФ [94—97], ДАНС [98—101], ФТГ [102—106]) и здесь не рассматривается. Росмус и Дейл [106a—106b] обобщили работы по методам идентификации N-концевых аминокислот в пептидах и белках.

Динитрофениламиноацетаты (ДНФ-аминокислоты)

Бреннер и др. [107] исследовали разделение производных данной группы на силикагеле. Эти соединения не растворяются ни в кислоте, ни в воде, не экстрагируются из раствора эфиром, но их можно разделить хроматографически, элюируя смесью *n*-пропанол—34 %-ный аммиак (7 : 3) (табл. 17.5). Из семи производных, приведенных в таблице, не удается разделить только ДНФ-цистеиновую кислоту и моно-ДНФ-цистин. Однако эти соединения редко сопутствуют друг другу, и, кроме того, их можно различить по окраске, которую они дают с нингидрином. Поскольку пробу наносят из кислого раствора, избыток кислоты

Таблица 17.5

Идентификация ДНФ-производных аминокислот, растворимых в кислоте и воде, на силикагеле со смесью *n*-пропанол—34 %-ный гидроксид аммония (7 : 3) [107]^а

ДНФ-аминокислоты	$R_f \times 100$	Окраска	Поглощение в УФ-свете ^б	Окраска с нингидрином
Моно-ДНФ-(Цис) ₂	29	Желтая	+	Коричневая
ДНФ-ЦиSO ₃ H	29	„	+	Желтая
α -ДНФ-Арг	43	„	+	„
ϵ -ДНФ-Лиз	44	„	+	Коричневая
O-ДНФ-Тир	49	Бесцветная	+	Фиолетовая
α -ДНФ-Гис	57	Желтая	+	Желтая
Ди-ДНФ-Гис	65	„	+	„

^а С разрешения авторов и Birkhaeuser Verlag.

^б На флуоресцирующих слоях имеют вид темных пятен.

следует тщательно удалить; с этой целью перед проведением хроматографического анализа пластинку нагревают 10 мин при 60°C. Для разделения более многочисленной группы кислотонерастворимых аминокислот, экстрагируемых эфиром, была отобрана группа из пяти растворителей (табл. 17.6). Растворитель I, представляющий собой двухфазную систему, состоит из смеси толуол—пиридин—этиленхлоргидрин—0,8 н. гидроксид аммония (10 : 3 : 6 : 6) [108]. Верхнюю фазу используют для разделения, а нижнюю — для предварительной обработки слоя, которую проводят следующим образом. Пластинки помещают в камеру для разделения, на дно которой налита нижняя фракция растворителя. Чтобы пластинки не соприкасались с растворителем, их закрепляют на стеклянных стержнях. Камеру выкладывают изнутри фильтровальной бумагой для создания в ней насыщенной атмосферы. Чтобы слои адсорбента не касались бумаги, в ней прорезают щели или закрепляют пластинки на стеклянных стержнях. Пластинки выдерживают в подготовленной таким образом камере примерно 12 ч, после чего извлекают и сразу накрывают полосками стекла, оставляя непокрытой только нижнюю часть пластинок, на которую наносят пробу. Накрывать пластинку надо для того, чтобы предотвратить испарение растворителя, который испаряется очень быстро, так что R_f ме-

няется уже спустя 2 мин. После нанесения проб пластинки сразу же элюируют верхней фазой первой системы. Несмотря на то что эта система часто вызывает образование «хвостов» зон, она обеспечивает хорошее разделение.

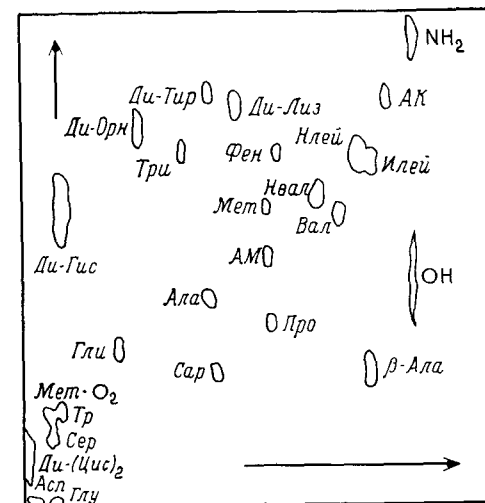


Рис. 17.1. Двумерная хроматограмма (13×13 см) 1 мкг ДНФ-производных аминокислот [107] (с разрешения авторов и Birkhaeuser Verlag).

Первое направление — элюирование толуольной смесью (см. текст); второе направление — элюирование смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота (95 : 5 : 1). Выделенные соединения. OH — 2,4-динитрофенол; Ди — ди-ДНФ-производные; NH₂ — 2,4-динитроанилин; AM — α -аминомасляная кислота; АК — α -аминокаприловая кислота; Ала — аланин. Асп — аспарагиновая кислота; (Цис)₂ — цистин; Глу — глутаминовая кислота; Гли — глицин; Гис — гистидин; Илей — изолейцин; Лей — лейцин; Нлей — норлейцин; Лиз — лизин; Мет — метионин; Мет·O₂ — метионинсульфон; Орн — орнитин; Фен — фенилаланин; Про — пролин; Сар — саркозин; Сер — серин; Тр — треонин; Три — триптофан; Тир — тирозин; Вал — валин; Нвал — норвалин

Поскольку одномерным хроматографированием полного разделения всех производных добиться нельзя, приходится проводить двумерное разделение с применением растворителей, перечисленных в табл. 17.6. Так, например, с помощью растворителей 1 и 4 можно разделить изомерные производные лейцина и валина. Проводя двумерное разделение, нельзя допускать окисления производных, и поэтому удаление растворителя после первого элюирования проводят как можно быстрее. Авторы рекомендуют после 10-минутной выдержки на воздухе просушить пластинку 10 мин при 60°C и затем 10—15 мин охлаждать. На рис. 17.1 показано двумерное разделение с применением толуольной смеси в одном направлении и смеси хлороформ—метанол—уксусная кислота (95 : 5 : 1) — в другом.

Величины $R_f \times 100$ ДНФ-производных аминокислот, растворимых в эфире и нерастворимых в кислоте, на силикагеле [107]^а

Растворитель ^б	A ^в	Б		В		Г		Д		
		Восходящая		Восходящая		Восходящая		Восходящая		
		косвенная	прямая	косвенная	прямая	косвенная	прямая	косвенная	прямая	
ДНФ- α -АМ ^е	46	72	44	73	42	52	55	79	85	75
ДПФ- α -АК ^ж	79	92	66	83	57	105	109	108	101	106
ДНФ-Ала	34	54	35	60	34	32	38	59	66	58
ДНФ- β -Ала	27	71	57	73	50	89	100	99	95	102
ДНФ-Асп	2	13	8	9	13	6	11	7	6	6
ДНФ-Глу	1	26	17	31	21	12	23	12	12	14
ДНФ-Глп	27	32	22	40	23	17	22	31	38	31
ДНФ-Лей	66	82	62	80	54	100	100	100	100	100
ДНФ-Илей	69	82	60	80	52	86	88	101	100	98
ДНФ-Мет	55	70	39	69	38	43	47	72	81	74
ДНФ-Мет-О ₂ ^и	17	—	—	—	4	3	2	10	10	7
ДНФ-Фен	67	75	46	74	41	44	52	81	86	76
ДНФ-Про	29	65	41	67	38	58	62	78	84	75
ДНФ-Сар	23	56	35	57	32	34	41	59	65	60
ДНФ-Сер	15	11	10	11	10	9	14	7	8	7
ДНФ-Тр	20	17	13	15	12	12	20	9	11	11
ДНФ-Три	65	69	38	69	31	23	33	54	61	49
ДНФ-Вал	53	79	56	77	51	76	85	91	98	86
ДНФ-Нвал	56	77	52	76	48	65	75	86	95	89
Ди-ДНФ-(Цис) ₂	—	3	2	1	1	0	2	0	2	2
Ди-ДНФ-Гис	53	11	9	8	4	5	8	12	16	14
Ди-ДНФ-Лиз	74	56	35	60	30	12	19	66	73	65
Ди-ДНФ-Орн	70	34	23	40	20	6	10	39	46	39
Ди-ДНФ-Тир	76	58	35	60	30	17	19	57	65	57
2,4-ДНФ-ОН ^к	41	100	76	83	55	22	23	148	102	111
2,4-ДНФ-NH ₂ ^л	90	90	84	72	63	115	129	131	101	115

^а С разрешения авторов и Völkhaeuser Verlag.

^б А — толуол—пиридин—этиленхлоргидрин — 0,8 н. гидроксид аммония (10 : 3 : 6 : 6) [107], см. также текст; Б — хлороформ—бензиловый спирт—уксусная кислота (70 : 30 : 3); В — хлороформ—трет-амиловый спирт—уксусная кислота (70 : 30 : 3); Г — бензол—пиридин—уксусная кислота (40 : 10 : 1); Д — хлороформ—метанол—уксусная кислота (95 : 5 : 1).

^в О применении растворителя А см. в тексте.

^г Величины R_f , отнесенные к R_f ДНФ-Лей.

^д Величины R_f , полученные после элюирования растворителем А, сушки и повторного элюирования

^е α -Аминомасляная кислота.

^ж α -Аминокаприловая кислота.

^и Метилоннисульфол.

^к 2,4-Диитрофенол.

^л 2,4-Динитроанилин.

Дроверт и др. [109] описали методику разделения аминокислот, меченных радиоактивными изотопами, двумерным хроматографированием с двумя разными растворителями. При проведении количественных определений слои пропитывали коллодием. По окончании разделения их отделяли от подложки и измеряли радиоактивность.

Блассу [110] удалось разделить ДНФ-лейцин и ДНФ-изолейцин, применив длительное элюирование смесями толуол—2-хлорэтанол—пиридин—25%-ный аммиак (20:12:6:1) (в одном направлении) и хлороформ—трет-амиловый спирт—уксусная кислота (95:5:1) (8 ч в другом направлении). С помощью системы Бреннера и др. [107] этого сделать не удалось. Вальц и др. [111] использовали разделение производных динитрофенила для обнаружения аминокислот в моче. Общее разделение проводили по методу Бреннера и др. [107]. Кроме основных растворителей эти авторы применяли еще четыре вспомогательных растворителя: толуол—пиридин—этиленхлоргидрин—25%-ный гидроксид аммония (50:35:15:7), хлороформ—метанол—уксусная кислота (70:30:5), пиридин и *n*-бутанол, насыщенные 25%-ным гидроксидом аммония при комнатной температуре. Результаты исследования показали, что разделение следует проводить двумерным хроматографированием при многократном элюировании.

Патаки [112, 113] применил новый метод обнаружения аминокислот в систематическом анализе пептидов. Он разделял аминокислоты на силикагеле G, используя смесь *n*-пропанол—вода (7:3), после этого высушивал пластинки и опрыскивал их буферным раствором, содержащим 8,4 г бикарбоната натрия и 2,5 мл 1 н. раствора гидроксида натрия в 100 мл раствора, и 10%-ным (масса/объем) раствором динитрофторбензола в метаноле. Затем накрывал хроматограмму чистым стеклом, закреплял его двумя полосками полиэтилена, пропущенными по углам хроматограммы, очищенным от адсорбента, и нагревал ее в темноте при 40°C в течение 1 ч. Далее он охлаждал хроматограмму и помещал ее в баню с эфиром на 10 мин. На обработанной таким образом и высушенной хроматограмме можно размечать пятна. После разделения аминокислот в одном направлении и превращения их в диаминофенилпроизводные их можно подвергнуть хроматографическому разделению в другом направлении с одним из уже упомянутых растворителей.

Мунье и Сарацин [114] анализировали растворимые в эфире ДНФ-аминокислоты, а растворимые в кислоте и воде производные сначала подвергали электрофорезу, а затем хроматографировали. Грант и Виккен [115] описали методику разделения на смешанных слоях. Пробу элюируют 15 мин смесью изопропанол—уксусная кислота—вода (15:2:3), далее хроматограмму

сушат и вновь элюируют сначала в том же направлении (на этот раз полностью) верхней фазой смеси бутанол—0,15 н. аммиак, а затем под прямым углом буферным 1,5 М раствором фосфата натрия (рН 6,0). Ванг и др. [116, 117] исследовали двумерное хроматографирование на полиамидных слоях сначала со смесью растворителей бензол—уксусная кислота (4:1), а затем четыреххлористый углерод—уксусная кислота (4:1). Авторы [116, 117] приводят также результаты, полученные с использованием дополнительных растворителей.

Из-за фоточувствительности ДНФ-производных желательно проводить их синтез и хроматографический анализ в отсутствие прямого освещения.

Ретни [118] получал диазотированные ДНФ-производные на тонких слоях, опрыскивая пробы сначала раствором триоксида азота в толуоле, а затем раствором фенола и диэтиламина в толуоле.

Фенилтиогидантоиновые (ФТГ) аминокислоты

Эти производные аминокислот образуются при разложении продуктов реакции белков или пептидов с фенилизотиоцианатом. Они очень удобны при изучении структур пептидов и позволяют отделить аминокислоты от мешающих анализу соединений. Кроме этого, с появлением усовершенствованного автоматического способа разделения аминокислот стал необходим метод идентификации этих соединений, поскольку за 72—90 мин с одним производным можно провести от 10 до 25 операций. В качестве такого быстрого метода идентификации соединений была предложена газовая хроматография; однако в ряде случаев результаты анализа недостаточно однозначны и требуют подтверждения.

Бреннер и др. [107] исследовали разделение ФТГ-производных на слоях силикагеля в четырех различных растворителях. Патаки [119] определил этим методом величины R_f для 34 производных аминокислот (табл. 17.7). Он же усовершенствовал этот метод [120], благодаря чему ФТГ-кислоты удается отделить от основной части пробы, проводя два двумерных и одно двумерное хроматографирование. Одно двумерное разделение осуществляют смесями хлороформ—метанол (9:1) и хлороформ—муравьиная кислота (20:1). Для второго двумерного разделения используют хлороформ и смесь *n*-гептан—1,2-дихлорэтан—муравьиная кислота—пропионовая кислота (30:10:7:6). Третье одномерное хроматографирование проводят со смесью следующих растворителей: хлороформ—метанол—муравьиная кислота (35:15:1).

Таблица 177

Величины $R_f \times 100$ ФТГ-производных аминокислот, полученные на силикагеле G. Длина пути разделения 18 см (среднее из шести определений) [119]^a

ФТГ-производные	Растворитель		
	хлороформ	хлороформ — метанол (9 : 1)	хлороформ — муравьиная кислота (20 : 1)
α -Аминомасляная кислота	26	79	54
α -Аминокаприловая кислота	44	84	67
α -Аминоизомасляная кислота	27	80	56
Аланин	18	77	44
Аргинин	0	1	0
Аспарагиновая кислота	0	2	16
Аспарагин	0	34	9
Цитруллин	0	34	8
Цистеиновая кислота	0	0	0
Глутаминовая кислота	1	5	18
Глутамин	0	40	11
Глицин	11	68	35
Гистидин	1	40	1
Оксипролин	5	64	28
Изолейцин	39	83	62
Тирозин	3	59	22
Лейцин	39	81	63
Лизин	12	78	34
Метионин	34	81	54
Метилглутамовая кислота	23	82	50
Метионинсульфоксид	0	54	15
Метионинсульфон	2	59	17
Метилсерин	1	51	18
Норлейцин	40	83	62
Норвалин	34	81	57
Орнитин	7	72	30
Фенилаланин	30	81	54
Пролин	60	89	70
Серин	1	43	10
Треонин	1	58	17
Триптофан	14	71	41
Валин	33	81	58
Фенилтиомочевина	12	65	32
Дифенилтиомочевина	42	82	71

^a С разрешения автора и H. R. Sauerlaender and Co.

Шербулье и др. [121] провели разделение ФТГ-производных с целью исследования структуры пептидов. Эти авторы рекомендуют применять дезактивированный диоксид кремния, содержащий 15 % воды.

В работах [122—124] описано разделение на слоях силикагеля, нанесенных на пластмассовые полоски. Элюирование при этом проводилось смесями гептан—пропионовая кислота—дихлорэтан (58 : 17 : 25) и гептан—бутанол—75 %-ная муравьиная кислота (50 : 30 : 9) [122]; верхний слой смеси бутилацетат—формамид—пропионовая кислота—вода (160 : 6 : 3 : 3) удобен при разделении кислых аминокислотных ФТГ-производных; смеси ксилол—метанол (8 : 1) полезны при идентификации пролина, а смесь ксилол—изопропанол (7 : 2) — лучший из этих трех смесей элюент общего назначения. Элюирование всеми перечисленными смесями проводилось в камере с ненасыщенной атмосферой на полосках Eastman Chromatogram 6060 [123]. Авторы работы [124] использовали для разделения смеси гептан—дихлорэтан—пропионовая кислота (9 : 5 : 6) и ксилол—метанол (8 : 1). После разделения проб хроматограммы изучали в УФ-свете, обрабатывали их реактивом на основе азида иода и смесью 1,7 %-ный нингидрин—коллидин—уксусная кислота (15 : 2 : 5). В результате эти авторы смогли идентифицировать продукты семи стадий разложения, протекающих в автомате Эдмана за 1 ч, и идентифицировать остаток.

Инглис и Никольс [125] проводили разделение на предварительно покрытых кизельгелем 60F 254 алюминиевых пластинках, на которых удается получать более четкие пятна меньшего размера, чем на слоях силикагеля. Разделение большого числа производных при этом улучшается, а цветные реакции с неполярными ФТГ-аминокислотами становятся более чувствительными. Смесь растворителей представляет собой модификацию смеси Эдмана Н: этиленхлорид—уксусная кислота (60 : 7).

Инглис и др. [126a] получали ФТГ-производные непосредственно на тонких слоях, добавляя 1 мкл гептафтормасляной кислоты к пятну аминокислоты и нагревая его в печи 10 мин при 140°C.

Для разделения ФТГ-производных использовались также слои полиамидов [127—132]. Саммерс и др. [128] разработали методику разделения и обнаружения субнаномолярных количеств этих производных путем введения бутил-ФДД [2-(4-трет-бутил-фенил)-5-(4-дифенил)-1,3,4-оксидиазол] в качестве флуоресцирующего агента в первый из растворителей системы для двумерного хроматографирования. Применяя двусторонние полоски полиамида (5×5 см), можно проводить опыты с двумя пробами в двух направлениях, затрачивая на это 30 мин. Кульбе [130] модифицировал систему растворителей для этого метода

разделения. Он предложил смесь толуол—*n*-пентан—уксусная кислота (30 : 15 : 8), содержащую 250 мг бутил-ФДД в расчете на литр, в качестве растворителя для первого разделения и 25 %-ную уксусную кислоту или 40 %-ный водный раствор пиридина—уксусную кислоту (9 : 1) для второго разделения. Нижний предел обнаружения в области 254 нм составляет от 0,05 до 0,2 нмоль. Этим методом можно анализировать от 10 до 20 проб в час; за то же время методом газовой хроматографии удастся проанализировать всего 2—3 пробы, которые вдобавок придется переводить в производные, пригодные для газохроматографического анализа. Кульбе [132] предложил две системы растворителей, пригодные для разделения ФТГ- или МГТ (метилтиогидантоин)-производных аргинина, гистидина и цистеиновой кислот, этилацетат—*n*-бутанол—уксусная кислота (35 : 10 : 1) и этилацетат—*трет*-бутанол—уксусная кислота (35 : 10 : 1). Обе смеси содержат флуоресцирующий реагент бутил-ПФД.

1-Диметиламино-5-нафталинсульфаниламинокислоты (ДАНС-аминокислоты)

Зайлер и Вейхман [133] исследовали разделение 1-диметиламино-5-нафталинсульфаниламинокислот (ДАНС-аминокислот) [134] на тонких слоях силикагеля. Используя метод двумерного хроматографирования смесями метилацетат—изопропанол—концентрированный аммиак (9 : 7 : 4) (в одном направлении) и хлороформ—метанол—уксусная кислота (15 : 5 : 1) или хлороформ—этилацетат—метанол—уксусная кислота (30 : 50 : 20 : 1) (в другом направлении), они добились почти полного разделения смеси 30 производных аминокислот. Перед вторым элюированием пластинки сушили 10 мин при 100°C. Поскольку вводимая в аминокислоту группа достаточно велика, метод отличается высокой чувствительностью. Таким способом при двумерном хроматографировании удается определить 10^{-10} моля кислоты; желтые флуоресцирующие пятна становятся заметными в УФ-свете на еще влажной хроматограмме.

Коул и др. [135] элюировали пробы на слоях силикагеля смесью бензол—пиридин—уксусная кислота (40 : 10 : 1) в течение 1,5 ч в одном направлении и затем *n*-бутанолом, насыщенным 0,2 н. раствором гидроксида натрия, в перпендикулярном направлении. При разделении производных лейцина и изолейцина второе элюирование проводили смесью *n*-бутанол—хлороформ (3 : 97).

Штегелин и Дюрантон [136] описали ступенчатое разделение на слоях силикагеля в виде узких полосок. Смеси, предназначенные для разделения в камерах с ненасыщенной атмосферой, содержали следующие компоненты: толуол—пиридин—уксусная

кислота (70 : 30 : 0,8), хлороформ—*трет*-бутанол—уксусная кислота (12 : 8 : 3) и толуол—2-хлорэтанол—25 %-ный аммиак (30 : 50 : 2,2). Для полного разделения валина, лейцина и изолейцина пластинку поворачивали на 180° и элюировали в течение часа смесью хлороформ—*трет*-бутанол—уксусная кислота (60 : 40 : 0,2).

Для разделения этих производных использовали также полиамидные слои. Казоли и Ди Маттео [137] элюировали пробу в одном направлении в течение 5 мин 3 %-ной муравьиной кислотой и еще 5 мин в перпендикулярном направлении смесью бензола и уксусной кислоты (45 : 5). Чтобы разделить ДАНС-аспарагиновую и ДАНС-глутаминовую кислоты и ДАНС-аспарагин и отделить ДАНС-глутаминовую кислоту от ДАНС-ОН и ДАНС-аланин от ДАНС-NH₂, проводили третье элюирование смесью этилацетат—метанол—уксусная кислота (20 : 1 : 1) в перпендикулярном первому элюированию направлении. Авторы работы [138] использовали те же два растворителя, изменив соотношения до 1,5 % и 4,5 : 1 соответственно. Для разделения ДАНС-аланин и ДАНС-NH₂ после первого элюирования применяли третью смесь бензол—уксусная кислота—этилацетат (22,5 : 5 : 1). Разделение на полиамиде идет быстрее, чем на силикагеле.

Мунье и др. [139—141] анализировали аминокислоты ТСХ на целлюлозе и сочетали ТСХ и электрофорез. В последнем случае они проводили двумерное разделение. Арно и Вард [142] использовали эту же методику, проводя анализ на целлюлозе. Электрофорез на целлюлозе можно проводить с буферным раствором состава 0,4 % пиридина и 0,8 % уксусной кислоты (рН 4,4) при напряжении 1000 В и температуре 12—15°C [143].

Деул и Росмус [144] применяли многослойный адсорбент (силикагель, оксид алюминия, полиамид), чтобы получить за один опыт три величины R_f . Растворителями служили смеси хлороформ—бензиловый спирт—уксусная кислота (70 : 30 : 3) и *n*-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15 : 10 : 3 : 12).

В табл. 17.8 приведены некоторые величины R_f ДАНС-аминокислот.

Нельзя не упомянуть о микрометодике Шмера и Крайля [147], предназначенной для обнаружения формильных и ацетильных групп в белках и пептидах. Лиофилизованную пробу (1—2 мг) растворяют в 0,5 мл 0,1 н. соляной кислоты и сушат в вакууме. Остаток нагревают 17 ч при 100°C в запаянной трубке с безводным гидразином. Избыток гидразина удаляют при пониженном давлении, а остаток обрабатывают 0,3 мл 0,2 М раствора буфера—цитрата натрия (рН 3,0) и 5—10-кратным избытком дансилхлорида (масса/объем) в 0,3 мл этанола. Смесь выдерживают 24 ч при 37°C (при этих условиях α -аминогруппы практически в реакцию не вступают). После сушки остаток

Таблица 17.8
 Величины $R_{\text{ДАНС-NH}_2} \times 100$ ДАНС-производных аминокислот, полученные с различными растворителями на силикагеле

ДАНС-аминокислоты	Растворитель ^а					
	[145]		[146]			
	А	Б	В	Г	Д	Е
ДАНС-NH ₂	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
ДАНС-Илей	90,5	83,5	92	100,0	100,0	89
ДАНС-Лей	87,5	67,5	89	100,0	99	63
ДАНС-Вал	82,5	75,0	85	100	97	75
ДАНС-Про	78,5	51,5	79	93	96	50
ДАНС-Фен	73,0	71,0	69	94	99	42
ДАНС-Мет	66,0	69,0	65	92	99	33
ДАНС-Ала	62	56	61	89	96	29
Ди-ДАНС-Лиз	55,0	82,0	48	93	96	33
Ди-ДАНС-Ори	49,0	79,0				
Ди-ДАНС-Тир	47,0	49,0				
ДАНС-Гли	44,0	46,0	38	65	93	12
ДАНС-Три	41,0	64,5	34	87	95	25
ДАНС-Тр	25,0	45,0	18	25	57	2
ДАНС-Гипро	30,0	36,0				
ДАНС-Глу	24,0	0,5	18	42	85	8
ДАНС-Сер	19,0	36,0	15	20	52	2
ДАНС-Мет-SO	15,0	58,0				
ДАНС-Мет-SO ₂	14,0	57,0				
ДАНС-Асп	8,0	0	6	2	60	0
ДАНС-Асн	8,0	20,0	2	2	10	3
ДАНС-Гли	8,0	29,0	3	7	14	0
ДАНС-Ори	0	14,0				
ε-ДАНС-Лиз	0	20,0	2	8	5	4
ДАНС-Ци-SO ₃ H	0	4,0				
ДАНС-ОН	0	67,0				
Ди-ДАНС-(Цис) ₂	5,0	9,0				
Ди-ДАНС-Гис	4,0	42,0				
ДАНС-Арг	0	29,0	0	0	0	0

^а Растворители А — толуол—пиридин—уксусная кислота (150:50:3,5), Б — толуол—2-хлорэтанол—25%-ный аммиак (100:80:6,7); В — бензол—пиридин—уксусная кислота (40:10:1); Г — хлороформ—трет-амиловый спирт—уксусная кислота (70:30:3); Д — хлороформ—трет-амиловый спирт—муравьиная кислота (70:30:1); Е — хлороформ—трет-амиловый спирт—уксусная кислота (70:30:0,5)

растворяют в 0,3 мл воды и трижды экстрагируют хлороформом. Экстракт концентрируют и в аликвотной части определяют хроматографически на силикагеле G формил- и ацетилдансилгидразин. В качестве элюентов опробованы такие смеси: а) бензол—пиридин—уксусная кислота (8:2:0,5), б) метилацетат—изопропанол—аммиак (9:7:4) и в) хлороформ—*n*-бутанол—уксусная кислота (6:3:1) и соответственно получены следующие величины R_f : а) 0,76 (формил) и 0,70 (ацетил), б) 0,82 и 0,92, в) 0,75 и 0,65. Двумерное разделение можно проводить со смесью в) в первом направлении и со смесью б) во втором, либо со смесями а) и в).

Карбобензокси- и трет-бутилоксикарбониламинокислоты (КБО- и БОК-аминокислоты)

Эрхардт и Крамер [148] продемонстрировали применение ТСХ при разделении КБО-аминокислот, а также соответствующих производных пептидов и эфиров пептидов. Эти производные играют важную роль в синтезе пептидов, а следовательно, весьма важно уметь отделить их друг от друга и от непрореагировавших компонентов. Для их разделения применяли различные смеси: *n*-бутанол—уксусная кислота—5%-ный гидроксид аммония, *n*-бутанол—уксусная кислота—вода—пиридин или гидроксид аммония. Если элюент представляет собой двухфазную смесь, то в камеру для разделения помещают обе фазы, но силикагель должен при этом контактировать только с верхней фазой. Эрхардт и Крамер [148] приводят список соединений с их величинами R_f (табл. 17.9). По окончании разделения пластинки сушат 10—15 мин при 120—150°C, после чего еще горячими опрыскивают 0,2%-ным раствором нингидрина в 95%-ном *n*-бутаноле, к которому добавляют 5% 2*n*. уксусной кислоты. Это приводит к разложению аминокислот, пептидов и гидрохлоридов эфиров аминокислот. Пластинки затем вновь нагревают до 120—150°C и опрыскивают насыщенным раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте. При этом пятна КБО-производных пептидов или аминокислот, содержащих фенильные группы, окрашиваются в темно-зеленый цвет. (Иногда пластинки после опрыскивания окислительной смесью нагревают на горячей плитке.)

Шелленберг [149] предложил реактив Т-168 в качестве надежного средства для обнаружения N-защищенных аминокислот и производных пептидов на слоях силикагеля. Патаки [150] пользуется для обнаружения карбобензоксиаминокислот модифицированным хлор-толуидиновым реактивом (Т-61), так как считает, что эта реакция более чувствительна, чем реакция с бихроматом калия в концентрированной серной кислоте.

Таблица 17.9

Величины $R_f \times 100$ карбобензоксидных (КБО) производных аминокислот, пептидов, сложных эфиров пептидов и соединений, не образующих производных с КБО, полученные на силикагеле G [148]^а

Анализируемые соединения	Растворитель ^б			
	А	Б	В	Г
КБО-Гли	81	76	74	64
КБО-Дигли	63	65	56	56
КБО-Тригли	57	56	41	50
КБО-Тетрагли	51	43	26	45
КБО—Дигли-этиловый эфир	82	73	75	74
КБО-Тригли-этиловый эфир	76	67	68	69
КБО-DL-Ала-Гли-этиловый эфир	81	75	79	77
КБО-DL-Ала	77	77	74	61
КБО-DL-Диаала	72	72	68	59
КБО-Гли-DL-Ала	68	68	63	56
КБО-DL-Ала-Гли	68	68	61	57
КБО-Гли-DL-Ала-Гли	61	59	50	54
КБО-DL-Фен-Гли-этиловый эфир	86	83	80	76
КБО-Гли-DL-Фен-этиловый эфир	84	79	77	76
КБО-Гли-Гли-DL-Фен-этиловый эфир	81	75	69	76
КБО-Гли-DL-Фен-Гли-этиловый эфир	83	78	76	74
КБО-DL-Ала-Фен	78	78	72	61
КБО-Гли-DL-Фен	72	76	69	65
КБО-Гли-L-Илей	75	73	74	67
КБО-Гли-L-Лей	74	74	69	65
КБО-Гли-Гли-L-лей	71	69	63	65
КБО-Гли-L-Глу	72	71	65	62
КБО-DL-Фен	74	76	77	75
Глу-Глу	17	25	4	15
DL-Ала-Глу	21	30	9	22
Гли-L-Лей	43	44	24	41
Гли	22	29	10	21
DL-Ала	27	34	14	27
DL-Фен	45	42	31	46
HCl-DL-Фен-этиловый эфир	59	52	44	65
HCl-Гли-этиловый эфир	43	42	24	53

^а С разрешения авторов и Elsevier Publishing Co.

^б А — *n*-бутанол—ацетон—уксусная кислота—5%-ный гидроксид аммония—вода (4,5:1,5:1:1:2); Б — *n*-бутанол—уксусная кислота—5%-ный гидроксид аммония (5,5:3:1:5); В — *n*-бутанол—уксусная кислота—5%-ный гидроксид аммония—вода (6:1:1:2); Г — *n*-бутанол—уксусная кислота—пиридин—вода (15:3:10:12); длительность элюирования 2 ч, длина пути элюирования 8—10 см.

Ванг и др. [151] применяли полиамид амилан 1001 (Toyo Rayon Co.) для создания устойчивого к растворителям слоя на полиэтилентерефталате для разделения этих производных. На слоях, выпускаемых в продажу фирмой Chen Chin Trading Co. Gallard-Schlesinger, можно провести анализ быстрее, чем на силикагеле.

Швайцер и др. [152] использовали для некоторых синтезов *трет*-бутилоксикарбонилпроизводные аминокислот и пептидов, так как эта защитная группа удаляется легко и исходное соединение при этом не затрагивается (что иногда происходит при удалении карбобензоксид- и других защищающих групп). Хроматографирование этих производных ведут на слоях силикагеля и оксида алюминия; элюируют их рядом смесей, включая *n*-пропанол—этилацетат—вода (7:1:2), *трет*-амиловый спирт—изопропанол—вода (100:40:55), *n*-бутанол—метилэтилкетон—дихлорогексиламиин—вода (10:10:2:5), *втор*-бутанол—изопропанол—хлоруксусная кислота—вода (70 мл:10 мл:3 г:40 мл), *втор*-бутанол—изопропанол—5%-ный диэтилбарбитурат натрия—вода (20:3:2:12) и хлороформ—метанол—17%-ный гидроксид аммония (20:20:9).

трет-Бутилоксикарбониламино кислоты дают отрицательную пробу на нингидрин, но если пластинку после разрешения прогреть 25 мин в печи при 125—130°C, а затем еще горячую опрыскать 0,25%-ным раствором нингидрина в бутаноле, то проба на нингидрин будет положительной.

Динитропиридил- и нитропиримидиламинокислоты (ДНПир- и НПм-аминокислоты)

Поскольку гидролиз, проводимый в процессе анализа пептидов и белков, сопровождается заметной деструкцией N-концевых групп динитрофенилпроизводных аминокислот, авторы [154] предложили вместо ДНФ ряд других реактивов. Белло и Синьор [155] разделили на тонких слоях силикагеля два типа производных аминокислот, а именно динитропиридил-(ДНПир) и нитропиримидил(НПм) производные. Количественно извлечение этих производных легко завершается за 15—20 мин гидролиза концевой пептидной связи 6 н. соляной кислотой, к которой добавлена 30%-ная муравьиная кислота. Разделение этих производных, которые можно извлечь из кислотных гидролизатов, было проведено с 6 различными системами растворителей. При двумерном разделении в одном направлении пробу элюировали смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота (95:5:1), в другом — смесью *n*-пропанол—30%-ный гидроксид аммония (7:3). ДНПир-аминокислоты хорошо видны при дневном или

в УФ-свете, а НПМ-аминокислоты можно обнаружить, опрыскивая пластинки 1 %-ным раствором перманганата калия и затем 1 н. соляной кислотой.

Эфиры аминокислот

Муссини и Маркучи [156] анализировали на слоях силикагеля G *n*-бутиловые эфиры 18 аминокислот. Разделение проводили смесью бензол—*n*-бутанол (3:1); этот элюент не вызывает смещения основных аминокислот — лизина, гистидина и орнитина. Для этих эфиров применяли смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (12:3:5). Дальнейшая работа с этой же системой позволила разделить бутилпроизводные пролина, дегидропролина и оксипролина [41]. В то же время, используя систему *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (12:3:5), удалось разделить нитропроизводные этих аминокислот. Мухилл и Джексон [42] также провели хроматографический анализ нитропроизводных L-пролина и L-оксипролина.

3. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Хроматографическое разделение

В литературе описаны методики разделения некоторых из этих соединений с помощью хроматографического анализа производных, в которых активные группы защищены; дополнительно следует отметить, что осуществлено также прямое разделение самих этих соединений.

Фельткамп и Пфроммер [157] провели хроматографический анализ диастереомерных дипептидов на слоях целлюлозы и силикагеля. Трипептиды разделяли хроматографически на слоях силикагеля со смесями *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1 или 4:1:5) и *n*-бутанол—муравьиная кислота—вода (5:1:1) [158]. Для разделения пептидов пригодны самые различные комбинации растворителей, в том числе и предназначенные для разделения аминокислот.

Швайцер и др. [159, 160] разделили на тонких слоях силикагеля и оксида алюминия синтетические кортикотропноактивные полипептиды.

Хискот и др. [161] использовали слои целлюлозы для двумерного хроматографирования со смесями изопропанол—бутанол—1 н. соляная кислота (12:3:5) или *n*-бутанол—бутанон—вода—аммиак (уд. масса 0,88) (80:5:17:3) для первого направления и 2-метил-2-бутанол—пропанон—метанол—вода—аммиак (уд. масса 0,88) (10:4:2:1:3:1) для второго направления. Пептиды обнаруживали реактивом Т-176. Бернс и Тернер

[162] пользовались методикой, разработанной для аминокислот [89] (см. дискуссию, касающуюся разделения аминокислот). Электрофорез проводили на очищенной целлюлозе MN 300 при 15°C в течение 25 мин при 50 В/см. Буферный раствор представлял собой смесь леядной уксусной кислоты, 98 %-ной муравьиной кислоты и воды (17:5:280, рН 2). Пробы наносили на тампоны Miracloth (Calbiochem). Чтобы удалить соединения, дающие положительную реакцию с нингидрином, тампоны промывали буферным раствором и помещали в промытую диализную трубку, разрезанную и сложенную так, чтобы тампон Miracloth не касался непосредственно слоя. Пластинку сушили при 30°C (при более высокой температуре усиливается адсорбция высших пептидов), а затем погружали в 1 %-ный раствор уксусной кислоты (см. «Электрофорез аминокислот»), чтобы объединить полосы в пятна. После повторной сушки проводили хроматографическое разделение в перпендикулярном первоначальному направлению, используя такие смеси, как *n*-бутанол—уксусная кислота—пиридин—вода (5:1:4:4), изобутанол—пиридин—вода (7:7:6) и *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (5:1:4, верхняя фаза). Иногда разделению способствует многократное или ступенчатое элюирование. Мунье и др. [163, 164] применяли также двумерное разделение с низковольтным (10 В/см) электрофорезом вдоль слоя целлюлозы (40×20 см) и последующим хроматографическим разделением по более короткому направлению.

Фурлан и Бек [164a] сравнивают два реактива для детектирования — флуорескамин и нингидрин — на примере обнаружения пептидов на слоях целлюлозы. В приведенном примере при анализе фрагмента „d“ фибриногена с помощью флуорескамина можно обнаружить не менее 35 пятен, а с помощью нингидрина только 20.

Менард и др. [165] использовали ТСХ для разделения и идентификации двух новых основных пептидов из *Zizyphus oenoplia*. Виланд и Георгопулос [166] применили двумерное хроматографирование при разделении пептидов на тонких слоях силикагель—гипс и силикагель—крахмал. Эти же авторы осуществили двумерное разделение, сочетая электрофорез и хроматографирование. Симонянова и Рыбак [167] провели разделение белков на слоях фосфоцеллюлозы, а Гофман [168] — на слоях гидроксиапатита. В последнем случае слои закрепляли растворимыми в спирте полиамидами.

Для разделения аминокислот, пептидов и белков применяли методы гель-фильтрации на сефадексе. Такой выбор весьма логичен, так как сефадекс обеспечивает разделение соединений в соответствии с их молекулярными массами. Детерман [169] разделял тирозин, тирозил-лейцил-глицилглутамилфенилала-

нин, продукт конденсации пластеин и альбумин сыворотки быка на тонких слоях сефадекса G 25, используя 0,05 М раствор гидроксида аммония. При приготовлении этих слоев сефадекс не следует пересушивать во избежание неравномерного разделения. Слои сушат лишь до тех пор, пока зерна геля еще остаются видимыми. Виланд и Детерман [170] описали методику градиентного разделения двух лактатдегидрогеназ из бычьего сердца на слоях DEAE-сефадекса.

Джоансон и Римо [171] разделяли на сефадексе G 75 искусственную смесь из альбумина бычьей сыворотки, β -лактоглобулина и α -лактальбумина. Пятна обнаруживали путем протравления в течение часа в концентрированном растворе Amidoblack в смеси метанол—уксусная кислота—вода (8:1:1). Избыток красителя удаляли повторной промывкой смесью метанол—уксусная кислота—вода (70:15:15). Эти же авторы [172] разделяли белки высокой молекулярной массы на сефадексе G-100 и G-200. Моррис [173] использовал также сефадексы G-100 и G-200 для разделения белков с молекулярной массой до 180 000. Для приготовления пластинок сефадекса выдерживали в растворителе 48 ч, чтобы гель набух; покрытые гелем пластинки выдерживали 18 ч в горизонтальном положении в замкнутом сосуде, содержащем растворитель. После нанесения пробы белка пластинки элюировали 0,5 М раствором хлорида натрия методом непрерывного восходящего элюирования под углом 10—20°, поместив с краю тампон из фильтровальной бумаги, который поглощал бы избыточный растворитель, покидающий пластинку. После окончания опыта слой осторожно покрывали листом фильтровальной бумаги ватман 3 MN, стараясь не захватить пузырьков воздуха; покрытую пластинку сушили 30 мин в печи при 80—90°C. Белки обнаруживали 30-минутным травлением в 0,2 %-ном растворе Popseau S в 10 %-ной уксусной кислоте и затем промывали, чтобы удалить избыток красителя. Чтобы повысить чувствительность, травление проводят 1 %-ным нафталиновым черным 12 В или 0,01 %-ным нигрозином в смеси метанол—вода—уксусная кислота (5:4:1) с последующей промывкой смешанным растворителем. Такое разделение обеспечивает образование компактных зон лишь со слабым размытием задней границы. На сефадексе G-100 с успехом удалось разделить цитохром с, овальбумин и тироглобулин, а на сефадексе — гемоглобин и гамма-глобулин (табл. 17.10). Фазелла и др. [174] исследовали разделение пептидов и белков на сефадексе, обработанном буферным раствором. При двумерном разделении хроматографирование сочетали с электрофоретическим разделением. Проводя опыты со стандартными веществами известной молекулярной массы, можно грубо оценить молекулярную массу неизвестных компонентов.

Таблица 17.10

Величины $R_{\text{Нб}} < 100$ белков, полученные на сефадексе G-100 и G-200 с 0,5 М раствором хлорида натрия [173] ^a

Белок	Молекулярная масса $\cdot 10^{-3}$	$R_{\text{Нб}}^b$	
		сефадекс G-100	сефадекс G-200
Цитохром с	13,0	68	74
Рибонуклеаза	13,6	68	74
Лизоцим	14,5	65	70
Многлобин	16,9	79	80
α -Химотрипсин	22,5	87	87
Трипсин	23,8	83	86
Овомукоид	27,0	94	103
Пепсин	35,0	99	104
Овальбумин	45,0	103	104
Гемоглобин	68,0	100	100
Бычий альбумин	65,0	114	122
Бычий γ -глобулин	180,0	128	154
Тироглобулин	650,0	133	183
Макроглобулин	1000	—	186

^a С разрешения автора и Elsevier Publishing Co

^b $R_{\text{Нб}} = R_f(\text{белок})/R_f(\text{гемоглобин})$

Для обнаружения разделенных веществ на слоях сефадекса его можно обработать непосредственно, как описано раньше; можно также прижать к слою полоску влажного фильтра и выдерживать 40—50 мин. Бумагу затем удаляют, сушат и опрыскивают реактивом для обнаружения. Этим методом удается перенести с сефадекса на бумагу примерно 20 % вещества [174].

Робертс [175] использовал усовершенствованную методику хлорирования [176] для обнаружения белков на сефадексе. Слои сушили 5—10 мин при 37°C, выдерживали в парах хлора 10—15 мин, далее обдували потоком воздуха и опрыскивали раствором, содержащим 20 % сульфата аммония и 5 % карбоната натрия (масса/объем), чтобы удалить избыток хлора. Через 15 мин пластинки опрыскивали иодо-крахмальным раствором (1 % каждого компонента, масса/объем). При этом на белом фоне пластинок проступали синие пятна. Чувствительность определения — менее 1 мкг белка.

Миллер и др. [177] перед гель-фильтрацией на сефадексе окрашивали белки красителем бриллиантовый оранжевый 2RS (Dylon). Белки (5—10 мг/мл) в фосфатном буфере (pH 7,6) смешивали с равным объемом красителя (10 мг/мл) в том же буфере. После 12-часовой выдержки смесь красителя и белка наносили непосредственно на тонкий слой. Для метки пустого объема использовали декстран оранжевый (мол. масса $2 \cdot 10^6$) [178]. Краситель не оказывает существенного влияния ни на результаты определения молекулярной массы, ни на величину R_f .

Радолла [178a, 178б] подробно рассмотрел различные аспекты гель-фильтрации белков и привел ряд примеров.

Разделение методом электрофореза и изоэлектрической фокусировки

Начало применения электрофореза этих материалов следует отнести к 1946 г., когда Консен и др. [179] впервые продемонстрировали применение тонкослойного электрофореза на слоях агара и силикагеля толщиной 1,4 мм для разделения аминокислот и пептидов. Методика приготовления различных слоев и способы разделения на них обсуждаются в гл. V, разд. 5.

В 1957 г. Виеме и Рабае [180] ввели ультрамикрорентгенофоретический метод разделения белков. Разделение белков проводилось на предметных стеклах микроскопа, покрытых гелем агара толщиной 1,5—2 мм. Таким способом удается определять порядка 0,1 мкг белка. Анализируемый раствор белка помещают либо в небольшое углубление, либо в желобок в геле; если аналитик располагает лишь небольшим кусочком ткани, ее можно нанести непосредственно на гель без предварительной экстракции. После электрофореза, занимающего от 10 до 30 мин, пластинки помещают на 30 мин в 5 %-ный раствор уксусной кислоты в 70 %-ном этаноле (объем/объем). Избыток фиксирующего раствора удаляют фильтровальной бумагой, после чего пластинку тщательно сушат при 37°C. Травление и промывку проводят обычным образом. В качестве примера авторы приводят разделение белков глазной жидкости при использовании 0,1 мл 0,02 %-ного раствора белка. Пользуясь усовершенствованной методикой, Виеме [181] разделял сыворотку здорового человека по крайней мере на 9 фракций: один (или два) преальбумин, альбумин, α_1 -глобулин, два α_2 -глобулина, три β -глобулина и непрерывный спектр γ -глобулинов. Из сыворотки больного удалось получить большее число фракций. Усовершенствования, введенные Виеме, состоят в следующем: применение высоковольтного градиента (15 В/см) для уменьшения длительности опыта и соответственно влияния диффузии. Необходимое

охлаждение достигается погружением пластинки в петролейный эфир. Чтобы предотвратить разрыв в местах соединения с электродными сосудами, контакт буферного раствора и электродных сосудов осуществляли большими блоками агара.

Виеме [182] выделил растворимые белки, полученные пункцией печени человека методом электрофореза агарового студня, не прибегая к гомогенизации. Ахарья и др. [183], Раманатан [184] и Попадюк [185] анализировали белки сыворотки методом электрофореза агарового студня на покровных стеклах. Петте [186] разделил за 60 мин цереброспинальную жидкость на 9 компонентов, используя электрофорез на агаровом студне (на покровных стеклах).

Бин и Раш [186a] разработали вертикальную микросистему для непрерывного электрофореза белков в гелях полиакриламида. Эти гели отливали в виде параллельных слоев с различным размером пор. После электрофореза при 150 В гели окрашивали реактивом Т-181а, чтобы определить общее содержание белков. Гликопротеины обнаруживали иодной кислотой — реакция Шиффа (Т-192), а липопротеины — красителем судан В (Т-248а). Неспецифические эстеразы определяли красителем синий прочный RR в сочетании с α -нафтолацетатом, выполняющим роль субстрата. Прекрасные результаты дает использование двух различных концентраций геля (8 и 12 %), образующих ступени мелкопористых гелей в одной полосе.

Ричард [187] разработал методику двумерного разделения пептидов: в одном направлении проводится хроматографическое разделение пробы, в другом — электрофорез. Адсорбентом служит силикагель G; перед опытом предварительно выявляют лучший растворитель при разделении ферментативного гидролизата белков. Автор методики приводит список восьми систем растворителей. В качестве нейтральных систем можно использовать *n*-пропанол или 96 %-ный этанол и воду (7:3); в качестве основных систем — *n*-пропанол или 96 %-ный этанол и 34 %-ный гидроксид аммония (7:3) или хлороформ—метанол—34 %-ный гидроксид аммония (2:2:1). К кислым растворителям относятся *n*-пропанол или 96 %-ный этанол—вода—уксусная кислота (7:2:1) или *n*-бутанол—вода—уксусная кислота (4:1:1). После выбора лучшего растворителя пробу подвергают хроматографическому анализу на тонкослойной пластинке размером 200×200 мм. Разделение предпочтительно вести методом восходящей хроматографии, однако при неудовлетворительном разделении можно прибегнуть и к непрерывному хроматографированию по методике Бреннера и Нидервизера [188] либо применить усовершенствованный прибор, описанный Ричардом. Пластинки затем удаляют и после 10-минутной сушки при 100°C охлаждают и опрыскивают соответствующим буфе-

ром для электрофоретического разделения, которое проводится при 950—1000 В и 30 мА. При такой высокой плотности тока пластинку следует соответствующим образом охлаждать (см. гл. V, разд. 5). Перед электрофоретическим опытом проверяют концентрацию пробы и устанавливают время, необходимое для анализа. Для этого наносят серию проб смесей пептидов различной величины в середине тонкослойной пластинки размером 200×200 мм. После опрыскивания буферным раствором пластинку помещают в прибор и в течение 30 мин ведут электрофоретическое разделение. Далее пробную пластинку сушат при 100°C и опрыскивают реактивом нингидрина, с тем чтобы определить оптимальную концентрацию и оптимальное время разделения. Буферный раствор для электрофореза состоит из смеси 1 мл пиридина в 10 мл ледяной уксусной кислоты, разбавленной до 500 мл, рН 3,5. В качестве примера можно указать, что на полученной рассмотренным способом хроматограмме ферментативного гидролизата миозина наблюдается свыше 60 пятен.

После разделения белков на агаровом студне электрофорезом ван дер Хельм и Хольстер [189] определяли фракции экстракционным методом. Слои агара наносят на полосу из пластмассы, сушат фильтровальной бумагой и окрашивают 100 мл водного раствора 0,5 г красителя амидного черного, 5 г хлорида ртути, 5 мл уксусной кислоты. После 30-минутной обработки пленку промывают 5 %-ной уксусной кислотой и сушат. Затем полосы белков вырезают, элюируют 1 мл комплексона (500 мг/л) в 0,5 н. растворе гидроксида натрия.

Из-за молекулярно-сиговых эффектов электрофорез на гелях крахмала обычно дает больше фракций, чем соответствующий электрофорез на агаровых студнях. Электрофорез на тонкослойных гелях крахмала предпочтителен по сравнению с электрофорезом на обычных гелях крахмала [190]. В некоторых случаях в тонкослойных гелях крахмала удается обнаружить фракции, которые нельзя выявить, работая с обычными гелями крахмала. Кроме того, если электрофорез проводится на тонких слоях, их не нужно разрезать после электрофореза.

Электрофорез на тонких слоях геля крахмала применяли для разделения белков сыворотки [191—193]. Для обнаружения фракций белка слои геля крахмала окрашивали красителем амидным черным 10 В. Обнаружение и идентификацию зон, разделенных электрофоретически, осуществляют методом иммуноэлектрофореза. Корнгольд [194] использовал метод, при котором зоны, полученные электрофорезом геля крахмала, диффундировали в слои агара, где они реагировали с нанесенной антисывороткой. Для этого после завершения электрофоретического разделения слой крахмала подрезали лезвием бритвы и осторожно переносили на слой агарового 1,2 %-ного студня. По-

верхность геля, находившуюся в контакте со стеклом, помещают после агара так, чтобы не образовалось воздушных пузырьков. Для завершения диффузии необходим час, после чего в обоих гелях прорезают узкие щели. Такие щели или борозды можно сделать резаком из двух лезвий бритвы. В эти борозды вносят антисыворотку (от 0,05 до 0,2 мл) и выдерживают 24 ч при комнатной температуре. По окончании выдержки крахмальный гель можно удалить и сделать теневым методом снимок осадка на агаровом студне.

Электрофорез на крахмальном геле использовали также для разделения и идентификации гемоглобинов [195—197]. Раймонд и сотр. [198—200] считают целесообразным проводить электрофорез на геле акриламида. Как и на крахмальном геле, при этом на акриламиде можно добиться лучшего разделения, чем на агаровом студне. Эти авторы исследовали разделение проб сыворотки на 3—25 %-ных гелях. Эти же авторы описали методику двумерного электрофореза. Согласно этой методике, электрофорез проводят в одном направлении при данной концентрации геля, затем полосу геля, содержащую разделенные белки, внедряют в слой геля другой концентрации и повторяют электрофорез в другом направлении. Эспиноза [201] использовал такой же принцип и проводил в одном направлении разделение на агаровом геле, а в другом — на крахмальном геле.

В этой главе говорилось о применении сефадекса для разделения белков. Этой же теме посвящены работы Йохансона и Римо [202] и Дозе и Краузе [203]. Одно из преимуществ сефадекса заключается в том, что разделяемые на сефадексе биологические препараты не теряют активности, тогда как разделение на бумаге и на слоях крахмала обычно сопровождается потерей активности.

Изоэлектрическое фокусирование является важным дополнением к другим методам разделения белков; многочисленные ссылки, касающиеся этого метода, приведены в гл. V, разд. 5. Ригетти и Драйсдейл [204] в общем обзоре по изоэлектрическому фокусированию в гелях также приводят примеры работ с тонкими слоями, особенно при двумерном разделении.

Радола [205] исследовал возможность применения различных гранулированных гелей для тонкослойного изоэлектрического фокусирования при разделении ряда белков и обнаружил, что лучшие результаты обеспечивает сефадекс G-75 Superfine.

Обнаружение зон проводилось следующим методом: снимали отпечаток на бумагу и окрашивали его одной или несколькими красками, обычно используемыми в электрофоретической работе.

Гель полиакриламида — наиболее широко используемая

среда для изоэлектрического фокусирования белков. Методы приготовления слоев и проведения анализа описаны в гл. V, разд. 5. Здесь мы дадим лишь несколько примеров применения: анализ бактериальных белков и антигены из Австралии [206], растворимых белков экстрактов роговицы [207], L-аминоксидазы [208], инсулина [209] и гормонов гликопротеинов [210].

Изоэлектрическое фокусирование в тонких слоях имеет ряд преимуществ перед другими вариантами этой методики [211]: обеспечивает легкость нанесения образца, позволяет применять простые приборы, экономит дорогие амфолитные носители, позволяет разделять в одинаковых условиях одновременно несколько смесей, причем высокая разделительная способность при этом сохраняется. Гели акриламида можно также окрашивать и подвергать денситометрическому анализу и, наконец, высушивать для хранения.

При двумерном разделении белков и пептидов возможны различные комбинации методов: электрофорез с градиентным гелем и изоэлектрической фокусировкой [212], гель-фильтрация с изоэлектрической фокусировкой [213], гель-фильтрация с электрофорезом [214], двумерный электрофорез с различными буферными системами [215—218], двумерная хроматография с различными растворителями [219—221] и хроматография в сочетании с электрофорезом или изоэлектрической фокусировкой. Райт и др. [222] оценивали результаты одно- и двумерного разделения сложных смесей белков, подсчитывая число разделенных полос, и установили, что двумерный электрофорез на геле акриламида дает большее число полос, чем периодический или непрерывный градиентный электрофорез на геле акриламида, изоэлектрическая фокусировка или изоэлектрическая фокусировка, сопровождаемая непрерывным градиентным электрофорезом на геле.

4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Денситометрия *in situ*

В работе [223] описано непосредственное определение аминокислот на тонких слоях целлюлозы сканированием при 523 нм после опрыскивания нингидрином. Относительное стандартное отклонение составляло 10 %, предел чувствительности 0,05 мкг. После обнаружения реактивом Т-176 зон, полученных на слоях целлюлозы, авторы работ [224—226] измеряли изменение отражательной способности при 490 нм; при обнаружении пролина или оксипролина пластинку обрабатывали реактивом Т-152, а измерение проводили при 620 нм. Чувствительность для большинства аминокислот составляла 0,5 нмоля. Мочу ана-

лизировали аналогичным образом, используя реактив Эрлиха (Т-90) [227]. Фродима и Фрай [228—229] определяли концентрацию аминокислот, измеряя отражательную способность; с этой целью пятна соскабливали со слоя и помещали материал в ячейку. Чтобы избежать одной из сушек, нингидриновый реактив растворяли в обнаруживающем растворителе.

ФТГ-аминокислоты определяли количественно на слоях силикагеля, измеряя отражательную способность при 269 нм [230]; чувствительность определения при этом составляла 0,5 нмоля.

Белки определяли денситометрически на гелях полиакриламида после окрашивания красителями Coomassie Blue [231], прочный зеленый [232] или амидный черный [233].

Измерения *in situ* флуоресценции и гашения

Один из методов определения ДАНС-аминокислот—измерение их флуоресценции в УФ-свете. При разделении на силикагеле чувствительность метода составляет 10^{-11} молей [234—237]. Измерения проводят в диапазоне 490—530 нм (длина волны возбуждающего излучения 313 нм) с воспроизводимостью 3—5 %. Поскольку выходы этих производных меняются с условиями приготовления, эти условия необходимо тщательно проверять. Указанные соединения также чувствительны к свету, и Пушан и Пассерон [238] подробно исследовали этот эффект. Для получения воспроизводимых результатов экспозицию в сканирующем свете следует строго стандартизовать, кроме того, отсчеты для неизвестных и стандартных пятен должны непосредственно следовать один за другим. В процессе измерения необходимо поддерживать постоянными: положение сканирующего прибора, интервал между сушкой и сканированием, объем пробы, путь, пройденный растворителем, и толщину слоя [239, 240]. Содержание влаги в слое также влияет на флуоресценцию [241], однако это влияние можно свести к минимуму, опрыскивая слой смесью триэтаноламин—изопропанол (1:4) [241, 242]. Чувствительность измерений на слоях полиамида выше, но на результатах сильно сказывается качество полиамида.

ДНФ-аминокислоты можно также определять *in situ* флуориметрически [239, 243].

Использование флуорескамина в качестве реактива для опрыскивания в ТСХ (Т-128) позволило создать другой метод флуоресцентного определения аминокислот *in situ* [244]. С этим реактивом можно на слоях силикагеля определять 10 нг соединения [245, 246]. Регленд и др. [246а] поместили белки

флуорескаминном перед разделением методом дискового гелеэлектрофореза и провели затем флуоресцентное сканирование. Таким способом можно определить до 6 нг миоглобина.

Методом гашения флуоресценции были определены ДНФ- и ФТГ-аминокислоты [239]. Относительное стандартное отклонение при этом составляло 5—7%. При сравнении пятен различных пластинок отклонения были больше.

Спектрофотометрические измерения после разделения

Для спектрофотометрических измерений концентраций аминокислот, разделенных на тонких слоях, слои вначале опрыскивают реактивом на основе нингидрина, затем элюируют окрашенное соединение и измеряют поглощение при 570 нм [89, 247]. Рустоу и Хок [248] обнаруживали хроматограммы растворителями, содержащими 1,3-диметилалоксан. Красные пятна, появляющиеся после 90-минутного нагревания при 70°C, более устойчивы, чем пятна, окрашенные нингидрином. Окрашенные зоны можно экстрагировать 70%-ным водным ацетоном и затем измерить их поглощение при 530 нм.

В литературе описана методика элюирования и последующего спектрофотометрического анализа элюатов ФТГ-[249], ТНФ-(340 нм) [250], 3-(нитро-2-пиридил)-(420 нм), 5-(нитро-2-пиридил)-(370 нм) [251] и ДНФ-производных (360 нм) [252, 253]. Флуоресценцию экстракта ДНФ-аминокислот измеряли также количественно при 510 нм при длине волны возбуждающего излучения 340 нм [254].

Радиоактивные определения

Для количественного определения аминокислот и их производных можно пользоваться также естественными радиоактивными индикаторами. Приведем несколько примеров. Так, используя дансилхлорид, меченный ^{14}C , и проводя разделение на слоях полиамида [125], для количественного определения этих производных в области 10^{-14} М можно воспользоваться автордиографией или сцинтилляционным счетом. Чувствительность определения дансилхлорида, меченного ^3H , выше на один порядок [256]. Дроверт и др. [257] анализировали динитрофенил-аминокислоты, меченные ^{14}C , пропитывая хроматограммы тонкой пленкой коллодия, удаляя пленку и измеряя затем радиоактивность пятен. Концентрацию подаминокислот, меченных ^{131}I , измеряют непосредственно на слоях [258].

Различные методы количественного определения

Количественное определение аминокислот проводят так же, измеряя площади пятен; точность определения составляет от ± 4 до $\pm 6\%$ [259—261]. Сен и др. [262] сравнивают относительную интенсивность окраски анализируемого вещества и стандарта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Niederwieser A., "Thin-Layer Chromatography of Amino Acids and Derivatives", in *Methods of Enzymology*, C. H. W. Hirs, Ed., **25B**, 1972, p. 60.
2. Pataki G., *Techniques of Thin-Layer Chromatography in Amino Acid and Peptide Chemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, 1968.
3. Bieleski R. L., Turner N. A., *Anal. Biochem.*, **17**, 278 (1966).
4. Stevens M. R., *Anal. Chem.*, **45**, 1543 (1973).
5. Dayman J., Coulson W. F., Smith I., Smith M. J., Jepson J. B., *Clin. Chim. Acta*, **40**, 335 (1972).
6. Frentz R., *Ann. Biol. Clin.*, **23**, 1145 (1965).
7. Nicot C., Cheftel R.-I., Moretti J., *J. Chromatogr.*, **31**, 565 (1967).
8. Lazarus W., *J. Chromatogr.*, **87**, 169 (1973).
9. Copley M. N., Truter E. V., *J. Chromatogr.*, **45**, 480 (1969).
10. Dréze A., Moore S., Bigwood E., *Anal. Chim. Acta*, **11**, 554 (1954).
11. Sowden F. J., *Soil Sci.*, **107**, 364 (1969).
12. Contractor S. F., Jomain P., *Clin. Chim. Acta*, **14**, 535 (1966).
13. Munier R. L., Drapier A.-M., *Chromatographia*, **2**, 340 (1969).
14. Neal M. W., Florini J. R., *Anal. Biochem.*, **55**, 328 (1973).
15. Niederwieser A., *J. Chromatogr.*, **61**, 81 (1971).
16. Niederwieser A., *J. Chromatogr.*, **54**, 215 (1971).
17. Rollins C., Jensen L., Schwartz A. N., *Anal. Chem.*, **34**, 711 (1962).
18. Heathcote J. G., Davies D. M., Haworth C., *Clin. Chim. Acta*, **32**, 457 (1971).
19. Boulanger P., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 696 (1949).
20. Nowakowski T. Z., Byers M., *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1313 (1972).
21. Pollock G. E., Miyamoto A. K., *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 104 (1971).
22. Thompson J. F., Morris C. J., Gering R. K., *Anal. Chem.*, **31**, 1028 (1959).
- 22a. Jacobson K. B., *Anal. Biochem.*, **38**, 555 (1970).
23. Brenner M., Niederwieser A., *Experientia*, **16**, 378 (1960).
24. Fahmy A. R., Niederwieser A., Pataki G., Brenner M., *Helv. Chim. Acta*, **44**, 2022 (1961).
25. Bancher E., Scherz H., Prey V., *Mikrochim. Acta*, **1963**, 712.
26. Chmel K., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **37**, 3034 (1972), also *J. Chromatogr.*, **84**, D105 (1973).
27. Kraas E., Stark E., Tjoeng F. S., Breitmaier E., Jung G., *Chem. Ber.*, **108**, 1111 (1975).
28. van Kerckhoven G., Blaton V., Vandamme D., Peeters H., *J. Chromatogr.*, **100**, 215 (1974).
29. Shellard E. J., Jolliffe G. H., *J. Chromatogr.*, **31**, 82 (1967).
30. Мардашев С. Р., Семина Л. А., Прозоровский В. Н., Сохина А. М., *Биохимия*, **32**, 761 (1967).
31. Voigt S., Solle M., Konitzer K., *J. Chromatogr.*, **17**, 180 (1965).
32. Cohen J. S., Putier I., *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 515 (1970).

33. *Pataki G.*, *J. Chromatogr.*, **17**, 580 (1965).
34. *Opienska-Blauth J.*, *Kraczkowski H.*, *Brzuszkiewicz H.*, "The Adaptation of the Technique of Thin-Layer Chromatography to Aminoaciduria Investigation", in *Thin-Layer Chromatography* G. B. Marini-Bettolo, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964, p. 165.
35. *Carisano A.*, *J. Chromatogr.*, **13**, 83 (1964).
36. *Pocchiari F.*, *Tentori L.*, *Vivaldi G.*, *Sci. Rept. Ins. Super. Sanita*, **2**, 188 (1962).
37. *Rokkones T.*, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **16**, 149 (1964).
38. *von Euler H.*, *Hasselquist H.*, *Limnell I.*, *Ark. Kemi.*, **21**, 259 (1963).
39. *Squibb R. L.*, *Nature*, **199**, 1216 (1963).
40. *Squibb R. L.*, *Nature*, **198**, 317 (1963).
41. *Marcucci F.*, *Mussini E.*, *J. Chromatogr.*, **18**, 431 (1965).
42. *Myhill D.*, *Jackson D. S.*, *Anal. Biochem.*, **6**, 193 (1963).
43. *Voigt S.*, *Solle M.*, *Konitzer K.*, *J. Chromatogr.*, **17**, 180 (1965).
44. *Seydel H.*, *Voigt R.*, *Pharmazie*, **24**, 531 (1969).
45. *Ploechl E.*, *Clin. Chim. Acta*, **21**, 271 (1968).
46. *Frei R. W.*, *Fukui I. T.*, *Lieu V. T.*, *Frodyrna M. M.*, *Chimia (Aarau)*, **20**, 23 (1966).
47. *Teichert K.*, *Mutschler E.*, *Rochelmeyer H.*, *Dtsch. Apoth.-Ztg.*, **100**, 283 (1960).
48. *Wollenweber P.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 369 (1962).
49. *Dittmann T.*, *Z. Klin. Chem.*, **1**, 190 (1963).
50. *Hoerhammer L.*, *Wagner H.*, *Kilger F.*, *Dtsch. Apoth.*, **15**, 1 (1963).
51. *Moczar E.*, *Robert L.*, *Moczar M.*, *Eur. J. Biochem.*, **6**, 213 (1968).
52. *Villaneuva V. R.*, *Barbier M.*, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **10**, 3992 (1967).
53. *Chiari D.*, *Roehr M.*, *Widtmann G.*, *Mikrochim. Acta*, **1965**, 669, also *J. Chromatogr.*, **23**, D3 (1966).
- 53a. *Lofis P. F.*, *Purdy S. J.*, *Truter E. V.*, *Lab. Pract.*, **18**, 1167 (1969).
54. *von Arx E.*, *Neher R.*, *J. Chromatogr.*, **12**, 329 (1963).
55. *Haworth C.*, *Heathcote J. G.*, *J. Chromatogr.*, **41**, 380 (1969).
56. *Heathcote J. G.*, *Washington R. J.*, *Haworth C.*, *Bell S.*, *J. Chromatogr.*, **51**, 267 (1970).
- 56a. *Heathcote J. G.*, *Al-Alawi S. J.*, *J. Chromatogr.*, **129**, 211 (1976).
57. *Sankoff I.*, *Gourkes T. L.*, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 1381 (1963).
58. *Wadman S. K.*, *de Jong H. F.*, *de Bree P. K.*, *Clin. Chim. Acta*, **25**, 87 (1969).
59. *Ögner G.*, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2185 (1969).
60. *Dittmann J.*, *Z. Klin. Chem.*, **1**, 190 (1963).
61. *Dittman J.*, *Z. Klin. Chem.*, **3**, 59 (1965).
62. *Bujard E.*, *Mauron J.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 19 (1966).
63. *Stuebchen-Kirchner H.*, *J. Chromatogr.*, **64**, 103 (1972).
- 63a. *Wieland T.*, *Buku A.*, *Anal. Biochem.*, **26**, 378 (1968).
64. *de la Llosa P.*, *Tertrin C.*, *Julisz M.*, *J. Chromatogr.*, **14**, 136 (1964).
65. *Lepri L.*, *Desideri P. G.*, *Coas V.*, *J. Chromatogr.*, **88**, 331 (1974).
66. *Vercaemst R.*, *Blaton V.*, *Peeters H.*, *J. Chromatogr.*, **43**, 132 (1969).
67. *Tyihák E.*, *Ferenczi S.*, *Hazai I.*, *Zoltán S.*, *Pathy A.*, *J. Chromatogr.*, **102**, 257 (1974).
68. *Hazai I.*, *Zoltán S.*, *Salát J.*, *Ferenczi S.*, *Dévényi T.*, *J. Chromatogr.*, **102**, 245 (1974).
69. *Cozzi D.*, *Desideri P. G.*, *Lepri L.*, *Coas V.*, *J. Chromatogr.*, **40**, 138 (1969).
70. *Rasteikiene L. P.*, *Pranskiene T. A.*, *Liet. TSR Mokslu Akad., Darbai, Ser B.*, **1963**, 5; through *Chem. Abstr.*, **60**, 6217 (1964).
71. *Ajfonso A.*, *J. Chromatogr.*, **22**, 452 (1966).
72. *Petrović S. M.*, *Petrović S. E.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 313 (1966).
73. *Turner N. A.*, *Redgwell R. J.*, *J. Chromatogr.*, **21**, 129 (1966).
74. *Molnár G.*, *Szarickai F.*, *Kiserl. Orvostud.*, **19**, 534 (1967); through *Chem. Abstr.*, **68**, 3657p (1968).
75. *Pal S.*, *Takács O.*, *Kiserl. Orvostud.*, **20**, 360 (1968); through *Anal. Abstr.*, **17**, 1604 (1969).
76. *Zappi E.*, "Identification of Circulating Iodoamino Acids by Thin-Layer Chromatography", in *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*, Vol. I. A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich., 1970, p. 147.
77. *Schorn H.*, *Winkler C.*, *J. Chromatogr.*, **18**, 69 (1965).
78. *Schneider G.*, *Schneider C.*, *Z. Physiol. Chem.*, **332**, 316 (1963).
79. *Mandl R. H.*, *Block R. J.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 25 (1959).
80. *Stahl E.*, *Pfeijle J.*, *Z. Anal. Chem.*, **200**, 377 (1964).
81. *Berger J. A.*, *Meyniel G.*, *Blanquet P.*, *Petit J.*, *Compt. Rend.*, **257**, 1534 (1963).
82. *Massaglia A.*, *Rosa U.*, *J. Chromatogr.*, **14**, 516 (1964).
83. *Zappi E.*, *Schmidt M.*, *Prange F.*, *J. Chromatogr.*, **43**, 543 (1969).
84. *Hollingsworth D.*, *Dillard M.*, *Bondy P. K.*, *J. Lab. Clin. Med.*, **62**, 346 (1963).
85. *Patterson S. J.*, *Clements R. L.*, *Analyst (London)*, **89**, 328 (1964).
86. *Ouellette R. P.*, *Balcus J. F.*, *J. Chromatogr.*, **24**, 465 (1966).
87. *Hamada S.*, *Ingbar S. H.*, *J. Chromatogr.*, **61**, 352 (1971).
88. *Honegger C. G.*, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 173 (1961).
89. *Bielecki R. L.*, *Turner N. A.*, *Anal. Biochem.*, **17**, 278 (1966).
- 89a. *Munier R. L.*, *Peigner A.*, *Thomnegay C.*, *Chromatographia*, **3**, 205 (1970).
90. *Montant Ch.*, *Touze-Soulet J. M.*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 161 (1960).
91. *Pastuska G.*, *Trinks H.*, *Chem.-Ztg.*, **86**, 135 (1962).
92. *Chudzik J.*, *Klein A.*, *J. Chromatogr.*, **36**, 262 (1968).
93. *Jentsch J.*, *Z. Naturforsch.*, **24b**, 264 (1969).
94. *Sanger F.*, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
95. *Levy A. L.*, *Chung D.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2899 (1955).
96. *Walz S.*, *Fahmy A. R.*, *Pataki G.*, *Niederwieser A.*, *Brenner M.*, *Experientia*, **19**, 213 (1963).
97. *Rao K. R.*, *Sober H. R.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1328 (1954).
98. *Deyl Z.*, *Rosmus J.*, *J. Chromatogr.*, **20**, 514 (1965).
99. *Seiler N.*, *Wiechmann J.*, *Experientia*, **20**, 559 (1964).
100. *Gray W. R.*, *Hartley B. S.*, *Biochem. J.*, **89**, 60P (1963).
101. *Gray W. R.*, *Hartley B. S.*, *Biochem. J.*, **89**, 379 (1963).
102. *Edman P.*, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277, 283 (1950).
103. *Edman P.*, *Acta Chem. Scand.*, **7**, 100 (1953).
104. *Sjoequist J.*, *Ark. Kemi.*, **11**, 129 (1959).
105. *Sjoequist J.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 20 (1960).
106. *Cherbuliez E.*, *Marszalek J.*, *Rabinowitz J.*, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1445 (1963).
- 106a. *Rosmus J.*, *Deyl Z.*, *Chromatogr. Rev.*, **13**, 163 (1971).
- 106b. *Rosmus J.*, *Deyl Z.*, *J. Chromatogr.*, **70**, 221 (1972).
- 106b. *Deyl Z.*, *J. Chromatogr.*, **127**, 91 (1976).
107. *Brenner M.*, *Niederwieser A.*, *Pataki G.*, *Experientia*, **17**, 145 (1961).
108. *Biserte G.*, *Osteux R.*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 50 (1951).
109. *Drawert F.*, *Bachmann O.*, *Reuther K.-H.*, *J. Chromatogr.*, **9**, 376 (1962).
110. *Blass J.*, *Chromatographia*, **2**, 178 (1969).
111. *Walz D.*, *Fahmy A. R.*, *Pataki G.*, *Niederwieser A.*, *Brenner M.*, *Experientia*, **19**, 213 (1963).
112. *Pataki G.*, *J. Chromatogr.*, **16**, 541 (1964).
113. *Pataki G.*, *Borko J.*, *Curtius H. C.*, *Tancredi F.*, *Chromatographia*, **1**, 406 (1968).
114. *Munier R. L.*, *Sarrazin G.*, *J. Chromatogr.*, **22**, 247 (1966).
115. *Grant W. D.*, *Wicken A. J.*, *J. Chromatogr.*, **47**, 124 (1970).

- 116 Wang K-T, Huang J M K, Wang I S Y, J Chromatogr, 22, 362 (1966)
- 117 Wang K-T, Wang I S Y, J Chromatogr, 24, 460 (1966)
- 118 Ratney R S, J Chromatogr, 11, 111 (1963)
- 119 Pataki G, Chimia (Aarau), 18, 23 (1964)
- 120 Pataki G, dissertation, Basil University, 1962
- 121 Cherbuliez E, Baehler B, Rabinowitz J, Helv Chim Acta, 47, 1350 (1964)
- 122 Jeppsson J S, Sjoquist J, Anal Biochem, 18, 264 (1967)
- 123 Inagami T, Murakami K, Anal Biochem, 47, 501 (1972)
- 124 Walz D A, Reuterby J, J Chromatogr, 104, 180 (1975)
- 125 Inglis A S, Nicholls P W, J Chromatogr, 79, 344 (1973)
- 126 Inglis A S, Nicholls P W, J Chromatogr, 97, 289 (1974)
- 126a Inglis A S, Nicholls P W, McK Strike P, J Chromatogr, 107, 73 (1975)
- 127 Wang K-T, Wang I S Y, Lin A L, Wang C-S, J Chromatogr, 26, 323 (1967)
- 128 Summers M R, Smythers G W, Oroszlan S, Anal Biochem, 53, 624 (1973)
- 129 Kulbe K D, Anal Biochem, 44, 548 (1971)
- 130 Kulbe K D, Anal Biochem, 59, 564 (1974)
- 131 Kulbe K D, Nogueira-Hattesoht Y M, Anal. Biochem, 63, 624 (1975)
- 132 Kulbe K D, J Chromatogr, 115, 629 (1975)
- 133 Seiler N, Weichmann J, Experientia, 20, 559 (1964)
- 134 Gray W R, Hartley B S, Biochem J, 89, 59P (1963)
- 135 Cole M, Fletcher J C, Robson A, J Chromatogr, 20, 616 (1965)
- 136 Stehelun D, Duranton H, J Chromatogr, 43, 93 (1969)
- 137 Casola L, Di Matteo G, Anal Biochem, 49, 416 (1972)
- 138 Lee M-L, Safille A, J Chromatogr, 116, 462 (1976)
- 139 Munier R L, Thommegay C, Drapier A. M, Chromatographia, 1, 95 (1968)
- 140 Munier R L, Drapier A M, Chromatographia, 5, 306 (1972)
- 141 Munier R L, Chromatographia, 1, 95 (1968)
- 142 Arnott M S, Ward D N, Anal Biochem, 21, 50 (1967)
- 143 Sloan B P, J Chromatogr, 42, 426 (1969)
- 144 Deyl Z, Rosmus J, J Chromatogr, 67, 368 (1972)
- 145 Zanetta J O, Vincendon G, Mandel P, Gombos G, J Chromatogr, 51, 441 (1970)
- 146 Morse D, Horecker B L, Anal Biochem, 14, 429 (1966).
- 147 Schmer G, Kreil G, Anal Biochem, 29, 186 (1969)
- 148 Ehrhardt E, Cramer F, J Chromatogr, 7, 405 (1962)
- 149 Schellenberg P, Angew Chem Int Ed Engl, 1, 114 (1962)
- 150 Pataki G, J Chromatogr, 16, 553 (1964)
- 151 Wang K-T, Chen K-Y, Weinstein B, J Chromatogr, 32, 591 (1968)
- 152 Schwyzer R, Iselin B, Kappeler H, Riniker B, Rittel W, Zuber H, Helv Chim Acta, 46, 1975 (1963)
- 153 Wolman Y, Klausner Y S, J Chromatogr, 24, 277 (1966)
- 154 Signor A, Scoffane E, Biondi L, Bezzi S, Gazz Chim Ital, 93, 65 (1963)
- 155 di Bello C, Signor A, J Chromatogr, 17, 506 (1965)
- 156 Mussini E, Marcucci F, J Chromatogr, 17, 576 (1965)
- 157 Feltkamp H, Pfrommer H, J Chromatogr, 18, 403 (1965)
- 158 Brtnick B, Trka A, Zaoral M, Collect Czech Chem Commun, 40, 179 (1975), through Chem Abstr, 82, 171425q (1975)
- 159 Schwyzer R, Riniker B, Kappeler H, Helv Chim Acta, 46, 1541 (1963)
- 160 Schwyzer R, Sieber P, Nature, 199, 172 (1963)
- 161 Heathcote J G, Washington R J, Keogh B J J Chromatogr, 104, 141 (1975)
- 162 Burns D J W Turner N A, J Chromatogr, 30, 469 (1967)
- 163 Munier R L, Favre B, Lebreau A, Chromatographia, 6, 14 (1973)
- 164 Munier R L, Favre B, Lebreau A, Chromatographia, 6, 71 (1973)
- 164a Furlan M, Beck E A, J Chromatogr, 101, 244 (1974)
- 165 Menard E L, Mueller J M, Thomas A F, Bhadnagar S S Dastoor N J, Helv Chim Acta, 46, 1801 (1963)
- 166 Wieland T, Georgopoulos D, Biochem Z, 340, 476 (1964)
- 167 Simonianova E, Rybak M, Biochem Biophys Acta, 92, 194 (1964)
- 168 Hofmann A F, Biochim Biophys Acta, 60, 458 (1962)
- 169 Determann H, Experientia, 18, 430 (1962)
- 170 Wieland T, Determann H, Experientia, 18, 431 (1962)
- 171 Johansson B G, Rymo L, Acta Chem Scand, 16, 2067 (1962)
- 172 Johansson B G, Rymo L, Acta Chem Scand, 18, 217 (1964)
- 173 Morris C J O R, J Chromatogr, 16, 167 (1964)
- 174 Fasella P, Giartosio A, Turano C, "Applications of Thin-Layer Chromatography on Sephadex to the Study of Proteins", in Thin Layer Chromatography, G B Marini Bettolo, Ed, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 205
- 175 Roberis G P, J Chromatogr, 22, 90 (1966)
- 176 Rydon H M, Smith P W G, Nature, 169, 922 (1952)
- 177 Miller J N, Erinle O, Roberts J M, Thirkettle C, J Chromatogr, 105, 317 (1975)
- 178 Muller J N, J Chromatogr, 65, 355 (1972)
- 178a Radola B J, J Chromatogr, 38, 61 (1968)
- 178b Radola B J, J Chromatogr, 38, 78 (1968)
- 179 Conders J, Gordon A H, Martin A J P, Biochem J, 40, 33 (1946)
- 180 Wieme R J, Rabaey M, Naturwissenschaften, 44, 112 (1957)
- 181 Wieme R J, Clin Chim Acta, 4, 317 (1959)
- 182 Wieme R J, Behringwerk Mitt, 34, 27 (1958)
- 183 Acharya U S V, Swaminathan M, Sreenivasan A, Subrahmanyam V, Indian J Med Res, 52, 224 (1964)
- 184 Ramanathan A N, Antiseptic (Madras, India), 60, 1017 (1963)
- 185 Popadiuk L, Arch Immunol Ter Dosw, 9, 139 (1961)
- 186 Petite D, Klin Wochenschr, 36, 1106 (1958)
- 186a Been A C, Rasch E M, J Histochem Cytochem, 20, 368 (1972)
- 187 Rutschard W J, J Chromatogr, 16, 327 (1964)
- 188 Brenner M, Niederwieser A, Experientia, 17, 237 (1961)
- 189 van der Helm H J, Holster M G, Clin Chim Acta, 10, 483 (1964)
- 190 Baur E W, private communication
- 191 Groulade J, Ollivier C, Ann Biol Clin (Paris), 18, 595 (1960)
- 192 Daams J H, J Chromatogr, 10, 450 (1963)
- 193 Mouray H, Moretti J, Fine J M, Bull Soc Chim Biol, 43, 993 (1961)
- 194 Korngold L, Anal Biochem, 6, 47 (1963)
- 195 Baur E W, J Lab Clin Med, 61, 166 (1963)
- 196 Berkeš-Tomašević P, Rosić J Berkeš I, Acta Pharm Jugosl, 13, 69 (1963)
- 197 Marsh C L, Jolliff C R, Payne L C, Tech Bull Regist Med Technol, 34, 1 (1964)
- 198 Raymond S, Ann N Y Acad Sci, 121, 350 (1964)
- 199 Raymond S, Aurell B Science, 138, 152 (1962)
- 200 Raymond S, Nakamuchi M, Anal Biochem, 7, 225 (1964)
- 201 Espinosa E, Anal Biochem, 9, 146 (1964)
- 202 Johansson B G Rymo L Biochem J, 92, 5P (1964)
- 203 Dose K, Krause G, Naturwissenschaften, 49, 349 (1962)
- 204 Righetti P G, Drysdale J W, J Chromatogr, 98, 271 (1974)
- 205 Radola B J, Biochim Biophys Acta, 295, 412 (1973)

206. *Wadstroem T.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **209**, 405 (1973).
207. *Bours J.*, J. Chromatogr., **60**, 225 (1971).
208. *Hayes M. B., Wellner D.*, J. Biol. Chem., **244**, 6636 (1969).
209. *Kohnert K.-D., Schmid E., Zuehlke H., Fiedler H.*, J. Chromatogr., **76**, 263 (1973).
210. *Graesslin D., Trautwein A., Bettendorf G.*, J. Chromatogr., **63**, 475 (1971).
211. *Leaback D. H., Rutter A. C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **32**, 447 (1968).
212. *Kenrick K. D., Margolis J.*, Anal. Biochem., **33**, 204 (1970).
213. *Drawert F., Mueller W.*, Chromatographia, **4**, 23 (1971).
214. *Dietrich C. P.*, Anal. Biochem., **51**, 345 (1973).
215. *Cronenberger J. H., Erdmann V. A.*, Anal. Biochem., **70**, 499 (1976).
216. *Wada H., Snell E. E.*, Anal. Biochem., **46**, 548 (1972).
217. *Mets L. J., Bogorad L.*, Anal. Biochem., **57**, 200 (1974).
218. *Hultin T., Sjoquist A.*, Anal. Biochem., **46**, 342 (1972).
219. *Tichy H.*, Anal. Biochem., **69**, 552 (1975).
220. *Heathcote J. G., Washington R. J., Keogh B. J.*, J. Chromatogr., **92**, 355 (1974).
221. *Heathcote J. G., Keogh B. J., Washington R. J.*, J. Chromatogr., **78**, 181 (1973).
222. *Wright G. L., Jr., Farrell K. B., Roberts D. B.*, Biochim. Biophys. Acta, **295**, 396 (1973).
223. *Kynast G., Dudenhausen J. W.*, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., **10**, 573 (1972).
224. *Heathcote J. G., Davies D. M., Haworth C., Oliver R. W. A.*, J. Chromatogr., **55**, 377 (1971).
225. *Heathcote J. G., Haworth C.*, J. Chromatogr., **43**, 84 (1969).
226. *Heathcote J. G., Haworth C.*, Biochem. J., **114**, 667 (1969).
227. *Heathcote J. G., Davies D. M., Haworth C.*, J. Chromatogr., **67**, 325 (1972).
228. *Frodyma M. M., Frei R. W.*, J. Chromatogr., **15**, 501 (1964).
229. *Frodyma M. M., Frei R. W.*, J. Chromatogr., **15**, 131 (1964).
230. *Zwolinski G. K., Treiber L. R.*, J. Chromatogr., **107**, 311 (1975).
231. *Fishbein W. N.*, Anal. Biochem., **46**, 388 (1972).
232. *Gorovskiy M. A., Carlson K., Rosenbaum J. L.*, Anal. Biochem., **35**, 359 (1970).
233. *Гофман Я. Я.*, Биохимия, **30**, 1160 (1965).
234. *Spivak V. A., Shcherbukhin V. V., Orlov V. M., Varshavskii Y. M.*, Anal. Biochem., **39**, 271 (1971).
235. *Spivak V. A., Orlov V. M., Shcherbukhin V. V., Varshavskii Y. M.*, Anal. Biochem., **35**, 227 (1970).
236. *Spivak V. A., Levjant M. I., Katrukha S. P., Varshavskii J. M.*, Anal. Biochem., **44**, 503 (1971).
237. *Spivak V. A., Fedoseev V. A., Orlov V. M., Varshavskii J. M.*, Anal. Biochem., **44**, 12 (1971).
238. *Pouchan M. I., Passeron E. J.*, Anal. Biochem., **63**, 585 (1975).
239. *Pataki G., Wang K.-T.*, J. Chromatogr., **37**, 499 (1968).
240. *Pataki G.*, Chromatographia, **1**, 492 (1968).
241. *Seiler M., Wiechmann M.*, Z. Anal. Chem., **220**, 109 (1966).
242. *Iaenchen D., Pataki G.*, J. Chromatogr., **33**, 391 (1968).
243. *Borko J., Frei R. W.*, Mikrochim. Acta, **1969**, 1144.
244. *Undenfriend S., Stein S., Bocklen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M.*, Science, **178**, 871 (1972).
245. *Felix A. M., Jimenez M. H.*, J. Chromatogr., **89**, 361 (1974).
246. *Sherma J., Touchstone J. C.*, Anal. Lett., **7**, 279 (1974).
- 246a. *Ragland W. L., Pace J. L., Kemper D. L.*, Anal. Biochem., **59**, 24 (1974).
247. *Clark M. E.*, Analyst (London), **93**, 810 (1968).
248. *Ruestow B., Hock A.*, Pharmazie, **24**, 453 (1969).
249. *Smith G. F., Murray M.*, Anal. Biochem., **23**, 183 (1968).
250. *Nitecki D. E., Stoltenberg I. M., Goodman J. W.*, Anal. Biochem., **19**, 344 (1967).
251. *Celon E., Biondi L., Bordignon E.*, J. Chromatogr., **35**, 47 (1968).
252. *Thorner J. P., Olson J. M.*, Biochemistry, **7**, 2242 (1968).
253. *Bogdanovsky D., Interschick-Niebler E., Schleißer K. H., Fiedler F., Kandler O.*, Eur. J. Biochem., **22**, 173 (1971).
254. *Zanetta J. P., Vincendon G., Mandel P., Gombos G.*, J. Chromatogr., **51**, 441 (1970).
255. *Neuhoff V., Weise M.*, Arzneim.-Forsch., **20**, 368 (1970).
256. *Burzynski S. R.*, Anal. Biochem., **65**, 93 (1975).
257. *Drawert F., Bachmann O., Reuther K. H.*, J. Chromatogr., **9**, 376 (1962).
258. *Wu C., Ling R. C.*, Anal. Biochem., **37**, 313 (1970).
259. *Нестеров В. В., Бельский Б. Ц., Эрлетов Д. П.*, Биохимия, **33**, 537 (1968).
260. *Pataki G., Keller M.*, Klin. Wochenschr., **43**, 227 (1965).
261. *Bancher E., Washuettl J., Oljat M. D.*, Mikrochim. Acta, **1968**, 773.
262. *Sen N. P., Somers E., O'Brien R. C.*, Anal. Biochem., **28**, 345 (1969).

Таблица 18.1

Величины $R_f \times 100$ некоторых антибиотиков на силикагеле [1]

Антибиотики	Растворители ^а					
	А	Б	В	Г	Д	Е
Стрептогрицин		26	52			
Неомицин В		51	46			
Катенулин		60	54			
Зигомицин А		62	56			
Канамицин		65	55			
Паромомицин		68	40			
Амминозидин		68	40			
Виомицин		11				
Бластицидин S		70				
Нистатин	18			18		
Пимарицин	34			34		
Амфотерицин				33		
Пентамицин	67			67		
Трихомицин	17			45		
Бацитрацин				58	13	
Антимицин А				72	81	
Бластмицин				82		
Гомомицин				42		
Новобиоцин				82		
Этамцин	66				80	
Пиридомицин	38				18	
Тиолутин	65				64	70
Ореотрицин	58				57	63
Митомицин С	54				45	38
Порфирамицин	50				50	48
Алтиомицин					78	
Хромомицин А ₃						
Спирамицин	8					65

^а А — бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1) (см. в тексте значения R_f для дополнительных антибиотиков в этом растворителе); Б — хлороформ—метанол—17%-ный гидроксид аммония (2:1:1), верхняя фаза; В — *n*-пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:10); Г — этанол—гидроксид аммония—вода (8:1:1); Д — этанол—вода (4:1); Е — этилацетат—метанол (20:3).

1. СИСТЕМЫ КЛАССИФИКАЦИИ

Благодаря высокой разделительной способности и экспрессности метод ТСХ очень удобен для разделения и идентификации антибиотиков. Икекава и др. [1] использовали слой силикагеля для исследования большого числа этих соединений (табл. 18.1). В дополнение к величинам R_f , приведенным в таблице, в работе даны $R_f \times 100$ ряда антибиотиков, полученные для смеси бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1): олендомицин 29, аммаромицин 38, эритромицин 39, пикромицин 41, карбомицин 55, лейкомицин 58, тилозин 59, тертиомицин В 63, тертиомицин А 86, унамицин А 36, амфотерицин А 33, пентамицин 67, актиномицин С 68, актиномицин J 73, теломицин 44, амфомицин 53, ацидомицин 74 и энтеромицин 73. Величина R_f бластмицина равна 0,78 для смеси хлороформ—метанол—17%-ный гидроксид аммония (2:2:1). Как правило, для разделения макролидов, пептидов или противогрибковых антибиотиков пригодна смесь бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1). Основные антибиотики удалось разделить, используя верхний слой смеси хлороформ—метанол—17%-ный гидроксид аммония (2:1:1) или пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:12). Полиеновые антибиотики элюируют смесями этанол—гидроксид аммония—вода (8:1:1), этанол—вода (4:1) или этилацетат—метанол (20:3). Для элюирования нуклеотидных антибиотиков применяли смесь этилацетат—метанол (2:1), а для их обнаружения — реактив Т-214.

Ито и др. [2] предпочитают проводить разделение подобных групп антибиотиков на слоях целлюлозы (целлюлоза MN 300) (табл. 18.2). Для обнаружения эти авторы применяют смесь *n*-пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:12). Другой важный обнаруживающий агент — это насыщенный водой бутанол, содержащий 2% *n*-толуолсульфокислоты.

Азалос и др. [3] разработали методику разделения сырых антибиотиков по группам: пробы элюируют строго определенными растворителями; при этом соединения одних групп перемещаются с растворителем, а соединения других групп остаются на стартовой линии. Первоначально набор из трех растворителей позволяет разделить антибиотики на четыре основные

Таблица 18.2

Значения $R_f \times 100$ и $R_g \times 100$ водорастворимых антибиотиков, полученные на целлюлозе со смесью пропанол—пиридин—уксусная кислота—вода (15:10:3:12) и их цветные реакции [2]^а

Антибиотик	$R_f \times 100$	$R_g \times 100$ ^б	Окраска
Реактив для обнаружения ОН ^в			
Глебомицин ^г	41	84	Красная
Стрептомицин ^д	44	90	„
Дигидрострептомицин ^д	44	90	„
Оксистрептомицин ^г	32	66	„
Нетропсин ^г	51	105	„
Реактив для обнаружения Н ^в			
Амидиномицин ^д	53	108	Красновато-фиолетовая
Гентамицин ^д	35	72	„
	28	57	Фиолетовая
	20	41	„
Стрептомицин ^д	26	53	„
Виомицин ^д	21	43	Коричневато-фиолетовая
Канамицин А ^д	17	35	Фиолетовая
В ^е	15	31	„
С ^е	23	47	„
Паромомицин ^д	15	31	„
Зигомицин ^д	15	31	„
Катенулин ^г	15	31	„
Неомицин ^д	10	20	„
Фрадиомицин ^д	10	20	„
Глюкозамин	49	100	Красновато-фиолетовая

^а С разрешения авторов и Japan Antibiotic Research Association.

^б $R_g = R_f$ (антибиотик)/ R_f (гидрохлорид глюкозамина).

^в ОН — окисленный п.тропрусид; Н — нингидрин.

^г Гидрохлорид.

^д Сульфат.

^е Свободная фаза.

группы, которые с помощью 11 дополнительных смесей растворителей в свою очередь подразделяются на 15 подгрупп. Таким образом была исследована группа из 84 антибиотиков. При небольшом числе антибиотиков в каждой подгруппе их можно дифференцировать методом ТСХ на забуференных до pH 2 или 11 слоях с помощью микробиологических или химических проб. Величины R_f определяют только для того, чтобы выяснить, смещается ли исследуемое соединение из исходной позиции. Испытания проводят на листах Eastman Chromagram со слоями силикагеля типа 13181 (ранее 6060). К группе I относят антибиотики, не смещающиеся ни в одном из трех начальных систем растворителей: а) метанол, б) 10 %-ный метанол в хлороформе и в) хлороформ. Антибиотики группы II перемещаются только с растворителем а); антибиотики группы III перемещаются с растворителями а) и б) и соединения группы IV перемещаются со всеми тремя растворителями. Каждую группу антибиотиков подразделяют далее на подгруппы, элюируя специально подобранной системой растворителей. Группу I делят на подгруппы Ia, Ib и Ic соответственно смесями пиридин—вода (1:1), пиридин—вода—абсолютный этиловый спирт (1:1:1) и пиридин—вода—абсолютный этиловый спирт (1:1:3). Группу II также делят на 3 подгруппы бутанол—метанол (1:1), хлороформ—метанол (1:1) и абсолютный этиловый спирт. Группу III также делят на подгруппы IIIa, IIIб и IIIв, элюируя смесями метанол—бензол (3:22), метанол—бензол (3:47) и метанол—бензол (1:24). Из группы IV смесью метанол—бензол (1:99) выделяют подгруппу IVa и смесью метанол—бензол—хлороформ (1:49:50) подгруппу IVб.

Данный метод предназначен для анализа проб сырых антибиотиков, он позволяет достаточно быстро установить, относится ли содержащийся в пробе антибиотик к уже известным. Это особенно полезно при исследовании сырых экстрактов, когда величины R_f сильно зависят от наличия других компонентов в смеси. При такой системе классификации в одну группу попадают антибиотики не обязательно близкого химического состава, и авторы метода считают это обстоятельство очень важным, поскольку вещества разного химического состава или строения легче обнаружить с помощью различных химических и микробиологических проб. Исак и др. [3а] использовали этот же принцип для классификации 151 антибиотика, обладающего антиопухолевыми свойствами. Они разделяли эти соединения на силикагеле тремя начальными указанными выше смесями растворителей и дополнительно в первую группу растворителей включили этилацетат. Соединения делили на 5 групп в зависимости от того, перемещаются они или не перемещаются этими четырьмя растворителями, а затем на 19 подгрупп 14 дополни-

тельными смесями растворителей. Авторы [3а] применяли также биоавтографические пробы.

В большинстве случаев при хроматографической классификации смесей антибиотиков используют метод хроматографии на бумаге.

Парис и Теалет [4] разделили 22 антибиотика на 7 групп, сочетая хроматографию на бумаге с электрофорезом. Шмитт и Матис [5] разделили 42 антибиотика на 4 группы на силикагеле G, элюируя пробы смесями: 1) хлороформ—метанол—уксусная кислота (45:4:1), 2) хлороформ—метанол—вода (80:20:2,5), 3) бутанол—уксусная кислота—вода (2:1:1) и 4) вода—лимоннокислый натрий—лимонная кислота (100:20:5). Со смесью III разделение проводили на силикагеле G, забуференном до pH 3 фосфатным буфером. Антибиотики близкого химического строения обычно попадают в одну хроматографическую группу. Например, макролиды группы II не перемещаются растворителем 1, тетрациклины группы III не перемещаются растворителями 1 и 2, а антибиотики типа стрептомицина не перемещаются растворителями 1, 2 или 3, но легко перемещаются растворителем 4. Группа I антибиотиков перемещается растворителями 1, 2 и 3 и в некоторых случаях 4. Вейланд и Вейсс [6] разработали систематическую методику идентификации антибиотиков в чувствительных дисках, которая предусматривает химический и спектрофотометрический анализ, ТСХ и хроматографию на бумаге 28 антибиотиков.

Хетгенраух и Шульце [7] разделяли серию антибиотиков гликозидного строения на слоях, представляющих собой смесь 50:50 силикагеля G и оксида алюминия. Элюируя пробу смесью *n*-пропанол—этилацетат—вода—25 %-ный гидроксид аммония (5:1:3:1), они установили следующие величины R_f (по отношению к паромоцину): стрептомицин 0,07, неомицин В+С 0,52, канамицин 0,70 и паромоцилин 1,00. Разделение проводили непрерывным методом на усовершенствованном приборе Бренера и Нидервизера [8].

Цвидвиг и др. [9] разделили 17 антибиотиков на сефадексе G-15. Их методика исключает применение органических растворителей, при неполном удалении которых в биоавтографических пробах иногда появляются ложные зоны торможения. Пластинки обрабатывают методом нисходящей хроматографии в сэндвичевом слое под углом 30°. После разделения пластинку прижимают на 30 мин к пластинке зернистого агара, покрытой полоской ткани хрусталика. Инкубацию проводят при оптимальной для исследуемых организмов температуре.

Вагман и Вайнштейн [10] опубликовали справочник «Хроматография антибиотиков», содержащий данные по разделению методами хроматографии на бумаге, ТСХ, электрофореза, газо-

вой хроматографии и противоточного распределения. В нем приведены величины R_f для ТСХ; соединения перечислены в алфавитном порядке.

Асзалос и Фрост [10а] опубликовали обзор работ по разделению антибиотиков методом ТСХ.

2. МЕТАБОЛИТЫ АКТИНОМИЦЕТОВ

Метод ТСХ применяли для выделения, очистки и идентификации различных продуктов метаболизма актиномицетов [11, 12]. Бек и др. [13] приводят величины R_f для нонактина и некоторых его гомологов, полученные на силикагеле G со смесью хлороформ—этилацетат (1:2): нонактин 0,62, монактин 0,48, динактин 0,32 и тринактин 0,15. Бикель и др. [14] установили значения R_f акумицина и ряда стандартных антибиотиков в трех различных растворителях на силикагеле G (табл. 18.3). Обна-

Таблица 18.3

Величины $R_f \times 100$ акумицина и стандартных антибиотиков группы макролидов, полученные на силикагеле G [14]^a

Антибиотик	Метанол	Хлороформ—метанол (95:5)	Хлороформ—метанол (1:1)
Акумицин	66	35	82
Анголамицин	65	18	82
Тилозин	68	7	81
Карбомицин	75	40	88
Форомацидин А	32	2	59
Форомацидин В	34	5	61
Форомацидин С	37	6	64
Эритромицин	16	3	29
Нарбомицин	22	12	41
Пикромицин	22	7	36
Ланкамицин	74	37	87

^a С разрешения авторов и Verlag Helvetica Chimica Acta.

ружение пятен они проводили обработкой серной кислотой или методом биоавтографии. С этой целью на поверхность заряженного бактериями слоя агарового студня помещали слои фильтровальной бумаги, после чего к бумаге прижимали в течение

примерно 20 мин пластинку размером 20×20 см с усилием около 2 кг. Слой агара инкубировали от 16 до 18 ч при 37°C .

Кассани и др. [15] описали хроматографический анализ актиномицина на силикагеле и оксиде алюминия. Отделить группу С от группы F можно на силикагеле с помощью ряда различных растворителей, среди которых лучшим оказалась смесь бутанол—уксусная кислота—вода (10:1:3), в этой смеси R_f для группы F равна 0,5, а для группы С — 0,7 при длине пути разделения 15 см. Отдельные соединения можно выделить на оксиде алюминия, проводя элюирование нижним слоем смеси растворителей этилацетат—*симм*-тетрахлорэтан—вода (3:1:3); при этом (длина пути разделения 12,5 см) получены следующие величины R_f : C_1 — 0,44; C_2 — 0,51; C_3 — 0,58; F_1 — 0,21 и F_2 — 0,35; эти соединения легко обнаружить по ярко-оранжевой окраске при наблюдении в УФ-свете.

Кондо и др. [16] провели разделение водорастворимых основных антибиотиков, продуцируемых стрептомицинами на активном угле, используя четыре типа пластинок из нейтрального и подкисленного активного угля с гипсом в качестве связующего и без него. Лучшие результаты получены на подкисленном угле. Для незакрепленных слоев суспензию готовили, смешивая 10 г активного угля, 30 мл 0,5 н. соляной кислоты и 30 мл метанола. Для слоев, содержащих гипс в качестве связующего, добавляли 0,5 г гипса и серную кислоту заменяли на соляную. Исследовали шесть смесей; лучшие результаты получены для смеси метанол—0,5 н. кислота (1:4) с добавкой соляной или серной кислот в зависимости от того, какую из кислот использовали при приготовлении золя для тонкослойного покрытия. Таким методом антибиотики были разделены на 4 группы: стрептомицин, стрептотрицин, фрадиомицин и канамицин. Насбаумер и Шордере [17] использовали тонкие слои силикагеля со смесями *n*-бутанол—вода—метанол (40:20:10) + *n*-толуолсульфокислота для идентификации стрептомицина и дигидрострептомицина.

Катаяма и Икеда [18] разработали методику двумерного разделения стрептомицинов, сочетающую ТСХ на силикагеле и последующий электрофорез. Полного разделения всех компонентов удалось достичь методом ТСХ в четыре этапа, используя 1) насыщенный водой бутанол, содержащий по 2% *n*-толуолсульфокислоты и пиперидина (растворитель S_1), с последующим электрофорезом в 1%-ном тетраборате натрия; 2) ТСХ с 3%-ным ацетатом натрия (растворитель S_2) с последующим электрофорезом в 1%-ном тетраборате натрия; 3) ТСХ с S_2 с последующим электрофорезом в буфере Михаэлиса—Веронала, рН 8,0, и 4) ТСХ с S_2 с последующим электрофорезом в 0,04 М буферном растворе формиата аммония, рН 3. Соединения обнаруживали реактивом Т-239.

Стрептомицин, дигидродезоксистрептомицин и дигидрострептомицин делили на силикагеле, элюируя 3%- или 4%-ным ацетатом натрия [19]. Стрептомицин и другие туберкулостатические антибиотики (канамицин, виомицин, циклозерин, рифамицин SV и капреомицин) разделяли вначале смесью ацетон—2%-ный ацетат натрия (9:1), а затем смесью *n*-бутанол—пиридин—метанол—уксусная кислота—вода (30:20:20:1:30) на силикагеле G [20].

Боровицкая [21] делила стрептомицин, неомицин, канамицин, паромомицин, гентамицин, мицерин (форма неомицина), фрамицетин и линкомицин на слоях силикагель—кизельгур (1:2), применяя смесь метанол—этилацетат—вода—25%-ный аммиак—пиридин—3,85%-ный ацетат аммония (10:2:6:2:1:20).

Келлер-Ширлайн и Ронкари [22] исследовали гидролиз продуктов ланкамицина.

3. ЭРИТРОМИЦИНЫ

Андерсон [22] разделял эти антибиотики на тонких слоях силикагеля, элюируя смесью метилхлорид—метанол—бензол—формамид (80:20:20:2—5). Влажность атмосферы лаборатории определяет процентное содержание формамида в растворителе. Чем выше влажность, тем меньше требуется формамида для разделения. Так, при 20%-ной ОВ (относительная влажность) требуется 5 объемов формамида, а при 30—40%-ной — 3—2 объема. Пятна обнаруживали опрыскиванием 10%-ной фосфолибденовой кислотой в этаноле или 50%-ным раствором серной кислоты. В обоих случаях после опрыскивания пластинки нагревали на горячей плитке. Фосфолибденовая кислота — более чувствительный реактив, но обработанные ею пятна обесцвечиваются через 1—2 ч, поэтому, если хроматограмму нужно сохранить, следует предпочесть обугливание серной кислотой.

Мальчевска-Конецка и др. [24] разделяли эритромицины А и С и ангидроэритромицин на силикагеле, используя верхний слой смеси этилацетат—изопропанол—15%-ный ацетат аммония (9:7:8), рН которого доведен до 10,1. Обнаружение проводили смесью 0,15%-ный раствор ксантидрола в смеси соляная кислота—уксусная кислота (12:1). Чувствительность определения составляла 0,05 мкг. Ричард и др. [25] использовали смеси метанол—0,02 н. ацетат натрия (4:1) на силикагеле G, приготовленном с 0,02 н. ацетатом натрия, для отделения эритромицина, эстолата эритромицина и этилсукцината эритромицина от некоторых продуктов разложения и фармацевтических сопутствующих продуктов. Эти же авторы определили R_f 23

других антибиотиков. Радецка и др. [26] применили прямой денситометрический метод для определения эритромицина и эстолата эритромицина в капсулах с теми же разделяющими средами. Обнаружение осуществляли реактивом Т-139. Точность данных колебалась от 2,1 до 3,4 % при чувствительности определения 5 мкг.

Майерс и Смит [27] описали методику биоавтографического анализа на незакрепленных слоях эритромицина и других антибиотиков. После завершения разделения хроматограммы сушат и покрывают увлажненной фильтровальной бумагой, положенной на чистую стеклянную пластинку. Затем хроматографическую пластинку переворачивают и края фильтровальной бумаги загибают назад, на носитель слоя. Удалив наружную стеклянную пластинку, прижимают бумагу, покрывающую слой, к зернистому слою агара (авторы приводят подробную методику приготовления такого слоя агара с использованием *Streptococcus lactis*) и выдерживают 2 ч при 37 °С.

Истербрук и Херсей [28] разработали метод тонкослойного анализа эритромицина и его эфиров с *Sarcina lutea* ATCC 9341 в качестве организма для испытания. Площадь зоны торможения измеряли, проецируя изображение на экран при 12-кратном увеличении. Установлена линейная зависимость между логарифмом концентрации вещества и корнем квадратным из площади пятна. Чувствительность определения на слоях, нанесенных на алюминий, колеблется в пределах от 0,03 мкг для оснований и стеаратов и до 0,05 мкг для эстолатов. Системами разделения служили системы Ричарда и др. [25]; пластинки предварительно промывались.

4. НЕОМИЦИНЫ

Бродаски [29] разделял сульфаты неомицинов на нейтральных и подкисленных слоях активного угля. Приготавливали слой следующим образом: 30 г угля Nuchar (С-190-N) и 1,5 г алебаstra взмучивали в 220 мл дистиллированной воды или воды, подкисленной серной кислотой до рН 2. Подкисленный угольный золь до нанесения на пластинки выдерживали 16 ч. Приготовленные пластинки сушили на воздухе. Для детектирования зон использовали метод диффузии в агаре, в который сделан посев *B. pumilus*; эту методику применяли и при проведении количественных определений, хотя точность ее не столь велика, как у метода радиоактивных индикаторов (см. гл. XI, разд. 6). Величины R_f сульфатов неомицинов приведены в табл. 18.4.

Неомицины А, В и С разделили на тонких слоях целлюлозы [30], элюируя смесью метилэтилкетон—изопропанол—6,5 н. аммиак (8:2:3). Неомицин А отделяли от неомицинов В и С

Таблица 18.4

Величины $R_f \times 100$ неомицинсульфатов, полученные с различными хроматографическими системами [29]^a

Неомицин	Подкисленный углерод, элюенты		Необработанный углерод, элюенты	
	H ₂ O	0,5 н. H ₂ SO ₄	H ₂ O	0,5 н. H ₂ SO ₄
А	60	61	0	54
В	10	21	0	24
С	10	43	0	45

^a С разрешения автора и Am Chem. Soc.

на силикагеле Н 3,85 %-ным раствором ацетата аммония [31]; неомицин С можно отделить от неомицинов А и В, применяя в качестве элюента 3,4 %-ный раствор аммиака. Стреттон и др. [32] разделили сульфат неомицина, сульфат полимиксина В и цинк-бацитрацин на силикагеле G со смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (15:11:3:19) ($R_f=0,14; 0,50; 0,61$) и *n*-бутанол—вода—пиридин—уксусная кислота—этанол (60:10:6:15:5) ($R_f=0,05; 0,34; 0,66$).

5. ПЕНИЦИЛЛИНЫ

Насбаумер [34, 35] разделил пенициллины после кислотного гидролиза. Анализируя продукт разложения пенициллина, он исследовал влияние 40 различных компонентов на идентификацию пенициллинов методом ТСХ. Этот же автор [36, 37] изучил возможность спектрофотометрического определения пенициллинов в различных фармацевтических препаратах. Прямому анализу этих антибиотиков мешают полиэтиленгликоли и стеараты натрия, однако предварительное разделение методом ТСХ позволяет отделить пенициллины от мешающих анализу соединений. Слой для хроматографического разделения приготавливают так: смешивают 20 % рисового крахмала с силикагелем G в фосфатном буфере (рН 5,8). Элюирование проводят смесью бутилацетат—*n*-бутанол—уксусная кислота—фосфатный буфер (рН 5,8) — метанол (80:15:40:24:5).

Фишер и Лаутнер [38] обследовали серию препаратов пенициллина, используя для разделения в насыщенной атмосфере слой силикагеля G и две смеси: ацетон—метанол (1:1) и изопропанол—метанол (3:7). Результаты исследования приведены

в табл. 18.5. Обнаружение проводилось с помощью иодоазидной реакции (Г-147). Реактив окрашивает пластинку в коричневый цвет, однако под каталитическим воздействием серосодержащей группы пенициллина на пластинках появляются белые пятна на черном фоне. В некоторых случаях наблюдается появление вторичных пятен часто желтого цвета, которые способствуют идентификации. Николаус и др. [39, 40] исследовали разделение пенициллинов V и G, 2,6-диметоксибензилпенициллина и

Таблица 18.5

Величины R_f различных пенициллиновых препаратов, полученные на силикагеле, при длине пути разделения в насыщенной атмосфере 12 см [38]^a

Пенициллин	Ацетон—метанол (1 : 1)		Изопропанол — метанол (3 : 7)	
	Белое пятно	Желтое пятно	Белое пятно	Желтое пятно
Калийная соль пенициллина G	0,16		0,22 0,48	
Калийная соль пенициллина V	0,68		0,64	
Кислота пенициллина V	0,68	0,54	0,74	0,24
Калийная соль α -феноксипенициллина	0,72		0,68	
Калийная соль пенициллина P	0,62		0,58	
Фенилмеркаптометилпенициллин	0,04 0,58		0,08 0,54	
Прокаинпенициллин	0,62	0,52	0,60	0,42
N,N'-Дибензилэтилендиаминдипенициллин G	0,58	0,52	0,56	0,24
N,N'-Дибензилэтилендиаминдипенициллин V	0,64	0,52	0,64	0,24
Эфир диэтиламиноэтанола и гидроксида пенициллина V	0,72		0,04 0,60	
Хлорбензилпирролидилметилбезимидазолпенициллин G	0,64	0,91	0,60 1,00	0,84

^a С разрешения авторов и Verlag Chemie.

6-аминопенициллановой кислоты. Для обнаружения пятен использовали биоавтографический метод. Перед проведением микробиологической пробы 6-аминопенициллановую кислоту превращают в пенициллин G на слое. Для бутанола, забуференного до pH 4,6, R_f 6-аминопенициллановой кислоты и пенициллина V соответственно равны 0,09 и 0,23; для смеси бутанол—вода—уксусная кислота (40:40:1) они составляют 0,26 и 0,56 соответственно. При проведении биологической пробы хроматографическую пластинку помещают на пластмассовый противень, который подрезают так, чтобы соответствующую ему пластинку с таким слоем можно было непосредственно облить зараженным (*Bacillus subtilis*) агаровым студнем. Поскольку при приготовлении агаровой среды применяют хлорид трифенилтетразолия, зараженную среду следует покрыть слоем стерильного агарового студня, чтобы предохранить от контакта с кислородом. Для обеспечения диффузии антибиотика в слой агара покрытую им пластинку выдерживают час в холодильнике при 0°C, после чего в течение 16 ч при 37°C выращивают микроорганизмы. Зоны антибиотика светло-желтые, а зоны роста бактерий красно-коричневые. Чувствительность определения этим методом от 0,01 до 0,1 мкг. Клайн и Голеб [41] обнаружили, что высушенную хроматограмму желательнее опрыскивать агаром при 100°C, применяя пистолет Де Вильбисса для разбрызгивания красок под давлением воздуха 2 атм. Такое покрытие предохраняет пятна антибиотиков от расплывания, когда пластинки помещают на подносы и покрывают зараженной средой.

Мак-Гильверей и Стрикленд [42] разделили группу пенициллинов на слоях целлюлозы MN 300 и на слоях силикагеля G. В табл. 18.6 указаны некоторые используемые для разделения растворители и приведены величины R_f . Для разделения ампициллина и гетациллина на слоях силикагеля вполне пригодна также смесь ацетон—уксусная кислота. Эти системы не позволяют отделить диклоксациллин от нафциллина или фенициллин от феноксиметилпенициллина. Нафциллин можно обнаружить по интенсивной желтой окраске, которую он дает с 50%-ной серной кислотой. Кроме нафциллина желтую окраску дает только метициллин, но у него другая величина R_f . Биаджи и др. [43, 44] исследовали влияние pH на разделение методом ТСХ с обращением фаз пенициллинов и сефалоспоринов. Экстраполированные величины R_M для пенициллинов приведены в табл. 18.6. Ауергофф и Кинцлер [45] делили пенициллины на силикагеле G, элюируя пробу смесью бензол—этилформиат—муравьиная кислота (80:15:6). Продукты расщепления оксациллина [46] и феноксиметилпенициллина [47] были проанализированы хроматографически Корчагиным и сотрудниками [47]. Вандамм и Фоетс [48] использовали 4 следующие смеси

Таблица 18.6

Величины R_M и $R_f \times 100$ ряда пенициллинов

Соединение	R_M [43,44] ^a			$R_f \times 100$ [42] ^b		
	pH 2,6	pH 7,4	pH 9,4	A	B	B
Диклосациллин	1,76	1,62	1,43	47	22	65
Клоксациллин	1,67	1,34	1,21	65	38	64
Нафциллин	1,43	1,39	1,20	47 (37) ^в	22	64
Оксациллин	1,39	1,05	0,96	74	49	65 (37)
Фенетициллин	1,35	1,03	0,91	84	73 (55)	66
Феноксиметилпенициллин	1,17	0,89	0,89	82	76 (56)	66
Бензилпенициллин	0,84	0,55	0,45	90	90	61 (28)
Метициллин	0,78	0,47	0,41	93	93	52 (18)
Ампициллин	0,11	0,07	0,05	97	98 (91)	12
Карбенециллин	-0,37	-0,46	-0,50			
Метиленампициллин		0,28				
Гетациллин				96	98	30 (12)

^a Силикагель, пропитанный 5%-ным раствором силикона DC в эфире; подвижная фаза: ацетат натрия—веронал (буфер) при указанном значении pH и некоторое количество ацетона или без него. Величины R_M рассчитаны для нулевого содержания ацетона [43, 44].

^b Адсорбент: A — целлюлоза MN 300 с 0,1 M раствором хлорида натрия в качестве элюирующего растворителя [42]; B — целлюлоза MN 300 с 0,3 M раствором лимонной кислоты, насыщенным *n*-бутанолом, в качестве элюирующего растворителя [42]; B — силикагель со смесью изоамилацетат—метанол—муравьиная кислота—вода (13:4:1:2) [42].

^в Числа в скобках относятся к вторичным пятнам.

растворителей при разделении продуктов спонтанного химического и ферментативного разложения пенициллинов и двух цефалоспоринов на силикагеле G: *n*-бутанол—вода—этанол—уксусная кислота (5:2:1,5:1,5), *n*-бутанол—вода—уксусная кислота (4:1:1), ацетон—уксусная кислота (19:1) и 85%-ный ацетон.

Мани и др. [49] применили метод измерения отражательной способности *in situ* для определения натрийпенициллина G в фармацевтических препаратах. После хроматографического разделения на силикагеле со смесью ацетон—хлороформ—уксусная кислота (10:9:1) авторы [49] измеряли отражательную способность пятен в области 230 нм. Стандартное отклонение со-

ставляло 5% для зон, содержавших 1 мкг пробы, и 1,5% для зон, содержавших 10 мкг. Синсхаймер и др. [50] определяли флуоресцентным методом *in situ* следы пенициллина. Бензилпенициллин гидролизovali пенициллиназой, подвергали затем хроматографическому разделению на силикагеле G со смесью диметилформамид—хлороформ—28%-ный аммиак (10:5:4) и измеряли при 510 нм интенсивность флуоресценции пятна с R_f 0,50 (длина волны возбуждающего излучения составляла 410 нм). Интенсивность флуоресценции пятен феноксиметилпенициллина, полученного в результате гидролиза (R_f 0,88), измеряли в области 480 нм при длине волны возбуждающего излучения 260 нм. Метициллин гидролизovali и измеряли интенсивность флуоресценции пятна с R_f 0,73 при 480 нм при возбуждающем излучении 350 нм. Пределы чувствительности в перечисленных выше определениях равны 3, 0,76 и 0,12 мкг соответственно. Пенициллановую кислоту определяли методом флуоресцентной денситометрии пятна с R_f 0,45 при 440 нм с возбуждением при 350 нм [51]. В этом случае после разделения на силикагеле смесью хлороформ—этилацетат—муравьиная кислота (60:40:1) пластинку выдерживали 3 мин в парах аммиака, чтобы образовался флуоресцирующий продукт. Полуколичественное определение пенициллинов и продуктов их превращения проводили визуально, сравнивая размеры пятен и их окраску [52, 53].

Цефалоспорин B и некоторые из его производных анализировали хроматографически на силикагеле G, используя смесь *n*-бутанол—уксусная кислота (10:1), насыщенную водой, а также смесь *n*-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода (17:12:4:15) [54]. Для некоторых специфических соединений применяли различные комбинации ацетона с бензолом (1:4; 2:3) и толуолом (2:3; 1:4; 3:7; 1:9), а также толуола и этилацетата (1:1). Биаджи и др. [55] разделили методом ТСХ с обращением фаз 13 цефалоспоринов. Разделение эти авторы проводили на силикагеле, пропитанном силиконом, применяя буферный раствор (pH 7,4) ацетат натрия—веронал, содержащий от 0 до 24% ацетона. По полученным данным были рассчитаны величины R_M . Бури [56] хроматографировал цефалоспорин B, цефалотин и цефалоридин на слоях силикагеля, забуференных фосфатным буфером (pH 5,8), элюируя их смесью изопропанол—метанол—фосфатный буфер с pH 5,8 (2:7:1).

6. РИФАМИЦИНЫ

Эти антибиотики разделяли с помощью ряда спиртов и ацетона на слоях силикагеля G [39, 57]. Ацетон оказался лучшим растворителем; проводя элюирование ацетоном, удается

отделить рифамицин В от рифамицина О, рифамицин SV от рифамицина S, а рифамицин В от рифамицина SV. Эти соединения интенсивно окрашены, и поэтому при достаточно высоких концентрациях их можно обнаружить на пластинках, не применяя реактив. Однако микробиологическим методом их можно обнаружить при гораздо более низких концентрациях. Для 2—20 мкг рифамицина и дезацетилрифамицина Колос и Эйдус [58] приводят величины R_f (0,55 и 0,37 соответственно), полученные при хроматографировании смесью хлороформ—этанол—0,1 н. соляная кислота (84:15,9:0,1) на хроматографических полосах № 6060 фирмы Eastman. Меджи и др. [59] провели хроматографический анализ групп полусинтетических рифамицинов на силикагеле с ацетоном.

7. ТЕТРАЦИКЛИНЫ

Николаус и др. [39, 40] исследовали также разделение тетрациклинов на тонких слоях силикагеля G. Они изучили большое число растворителей; четыре лучших растворителя указаны в табл. 18.7, там же даны соответствующие величины R_f . В дополнение к приведенным в таблице результатам следует указать, что окситетрациклин и диметилтетрациклин можно отделить от тетрациклина, хлортетрациклина и дезокситетрациклина, элюируя смесь 10 %-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным бутанолом. Обнаруживают тетрациклины, опрыскивая пластинки 1 н. соляной кислотой и затем нагревая их при 50 °С. Тетрациклины обнаруживают в виде желтых пятен. Для обнаружения дезокситетрациклина используют реакцию сочетания с солью диазония. При проведении микробиологической пробы агар заражают *Bacterium subtilis*.

Авторы работы [60] разделяли тетрациклин, хлортетрациклин, диметилхлортетрациклин и их ангидро- и эпипроизводные на промытом кислотой кизельгуре G, пропитанном 20 %-ным раствором полиэтиленоксидгликоля 400 в смеси глицерин—0,1 М ЭДТА при pH 7 (1:19). Разделяющим растворителем был органический слой смеси этилацетат—0,1 М ЭДТА, pH 7 (6:1). При рассмотрении пластинок в длинноволновом УФ-свете можно обнаружить 0,05 мкг антибиотика. В работе [61] описана методика разделения тетрациклинов и продуктов их превращения на кизельгуре, пропитанном ЭДТА; величины R_f и применявшиеся растворители указаны в табл. 18.7.

Количественное определение ангидротетрациклинов в разложившихся таблетках тетрациклина проводили, экстрагируя зоны ТСХ и измеряя коэффициент поглощения при 428 нм [62]. При определении эпитевтетрациклина и хлортетрациклина зону первого соскребали, элюировали 0,1 н. соляной кислотой [63] и изме-

Таблица 18.7

Величины $R_f \times 100$ некоторых тетрациклинов, полученные с различными хроматографическими системами

Соединение	Силикагель ^а				Кизельгур ^{а, б}		
	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж
Тетрациклин	36	38	61	50	53	36	Ро
Хлортетрациклин	30	43	72	60	76	60	Ро
Ангидротетрациклин	0—20	45	68	50	93	83	Ро
Окситетрациклин	58	41	70	55	60	20	Ж
Ангидрохлортетрациклин	0—20	46	75	52	83	57	Ро
Диметилхлортетрациклин					73	44	Ро
Метациклин					44	29	Ро-Ко
Доксициклин					53	27	Ро-Ко
4-Эпитетрациклин					20	12	Ж
Эпиагидротетрациклин					47	50	Ж-Ро
4-Эпихлортетрациклин					33	21	Ж-Ро

^а Растворитель: А — 10 %-ная лимонная кислота [39]; Б — *n*-бутанол—метанол—10 %-ная лимонная кислота (4:1:2) [39]; В — *n*-бутанол—метанол—10 %-ная лимонная кислота (4:2:2) [39]; Г — *n*-бутанол—метанол—10 %-ная лимонная кислота (4:3:2) [39]; Д — метилэтилкетон, насыщенный буфером Мак-Ильвейна, pH 4,7 [61]; Е — дихлорметан—этилформиат—этанол (9:9:2), насыщенный тем же буфером [61]; Ж — цветная реакция с Т-115, Ро — розовый, Ж — желтый, Ко — коричневый. Чувствительность 1 мкг [61].

^б Кизельгур G, суспендированный в смеси 0,1 М раствор ЭДТА—25 %-ный раствор ПЭГ 400 в глицерине (19:1, по объему). Пластины сушат около 4 ч при комнатной температуре, затем предварительно элюируют растворителем Д и вновь сушат [61].

ряли поглощение элюента при 356 нм. Хлортетрациклин после элюирования 0,2 н. гидроксидом натрия измеряли по интенсивности флуоресценции в области 414 нм (длина возбуждающего излучения 356 нм). Радека и Вильсон [64] проводили определение тетрациклина в фармацевтических препаратах *in situ*. Хотя этот метод менее точен, чем спектрофотометрический метод Альварца Фернандеца и др. [65], он более чувствителен, требует меньше времени и более точен, чем официальные микробиологические методы. Ван Хоек и др. [66] разработали для этой группы соединений флуорометрический метод определения *in situ*.

8. ПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

Полимиксиновые антибиотики представляют собой пептиды очень близкого строения. Кроме аминокислот в их молекулу входят жирные кислоты. Иглоу и др. [67, 68] разделяли полимиксины В, D и M на силикагеле G, используя смесь ацетон—вода—уксусная кислота—2 н. гидроксид аммония (15:5:1:2). Полимиксин E (колистин) не удается отделить от полимиксина В. Хоуллетт и Зельцер [69] разработали метод дифференциации этих двух соединений: пробу гидролизуют 5 н. соляной кислотой в запаянной трубке 6 ч при 120°C и определяют аминокислотный состав хроматографически в камере с насыщенной атмосферой на слое силикагеля MNG, используя раствор 68 мг иодида калия в 84 мл 90 %-ного фенола и 16 мл воды. Нингидриновая проба позволяет обнаружить L-2,4-диаминомасляную кислоту, L-треонин, фенилаланин и лейцин в пробе полимиксина В, в то же время при хроматографировании колистина пятно фенилаланина обнаружено не было. Хамерс и Моерлуз [70] предпочитают проводить 22-часовой гидролиз при 110°C, чтобы избежать появления ложных пятен.

Хиномициновые антибиотики — это пептидные лактоны с линкоксалиновым кольцом, отличающиеся друг от друга только своей N-метиламинокислотной долей. Шой [71] подвергал хроматографическому разделению соединения А, В, В₀, С, D и E методом круговой хроматографии на оксиде алюминия, применяя нижнюю фракцию смеси этилацетат—1,1,2,2-тетрахлорэтан—вода (3:1:3). Таким способом удалось разделить все компоненты, кроме В и В₀. Хроматографирование проводили на флуоресцентном слое и рассматривали пластинки в УФ-свете.

Штудер и др. [72—76] при определении строения энниатина В синтезировали ряд циклических пептидов с активностью антибиотиков. В смеси бензол—эфир—метанол (17:2:1) на силикагеле энниатины А и В характеризуются R_f 0,39.

9. ПОЛИЕНОВЫЕ МАКРОЛИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

Икекава и др. [1] разделили шесть полиенов на силикагеле G, используя смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1), и получили при этом следующие величины R_f : нистатин 0,18; пимарицин 0,34; унамицин А 0,36; амфотерицин А 0,33; пентамицин 0,67 и трихомицин 0,17. Бержи и Эбле [77] разделили на силикагеле HF, забуференном смесью 0,2 М дигидрофосфат калия—0,2 М гидрофосфат натрия (1:1), элюируя пробу смесью метилхлорид—метанол (17:3). Выделенные компоненты характеризуются следующими величинами R_f :

I 0,8; II 0,7; III 0,6; IV 0,5. Охаб [78] разделил на силикагеле трихомицин, фумагиллин, натамицин, нистатин, амфотерицин А и амфотерицин В. Лучшие результаты дают смеси этанол—аммиак—вода—диоксан (8:1:1:1) и *n*-бутанол—пиридин—вода (3:2:1). Мартин и Мак-Даниел [79] разделили комплекс кандигексина на силикагеле G на пять компонентов со следующими величинами R_f : А 0,26; В 0,29; D 0,36; E 0,39 и F 0,43. Комплекс кандидина удалось разделить на две фракции с R_f 0,27 (А) и 0,32 (В). Третий компонент с R_f 0,36, о наличии которого в сырых препаратах кандидина сообщили Боровский и др. [80], в очищенных препаратах обнаружить не удалось. Элюирование проводилось нижней фракцией смеси хлороформ—метанол—20 %-ный гидроксид аммония (2:2:1). Количественное разделение достигается денситометрированием *in situ* кандигексина при 340 нм и кандидина при 360 нм.

10. РАЗЛИЧНЫЕ ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Берд и Стевенс [81] использовали ТСХ для выявления примесей в нитрофуразоне — синтетическом антибактериальном соединении. При хроматографировании на силикагеле G смесью бензол—ацетон R_f нитрофуразона составляет 0,23. Одна из примесей, 5-нитро-2-фуральдазин, перемещается с фронтом растворителя, R_f другой примеси равен 0,65.

Маер и Шафнер [82] исследовали антибиотики методом ТСХ на силикагеле со смесью хлороформ—метанол—28 %-ный гидроксид аммония—вода (1:4:2:1), дополнив ТСХ при определении некоторых ацетилпроизводных хроматографированием на бумаге. В результате эти авторы показали, что в данный комплекс входит 16 антибиотиков. Величины R_f большинства компонентов приведены в табл. 18.8. Вагман и др. [83] выделили из этого комплекса четыре примесных компонента (табл. 18.8). Вильсон и др. [84] осуществили хроматографическое разделение в этой же системе некоторых примесных компонентов.

Патулин, фурапираноновый антибиотик, выделенный из ряда грибов, был подвергнут хроматографическому анализу с применением большого числа растворителей (табл. 18.9). Скотт и Кеннеди [85] разработали количественный метод обнаружения этого антибиотика в яблочном соке, основанный на установлении минимально определяемой флуоресценции, когда слой силикагеля опрыскивают 0,5 %-ным раствором 3-метил-2-бензотиазолингидразона и нагревают 15 мин при 130°C.

Фишер и Ригельман [90] разработали флуоресцентный метод определения *in situ* гризеофульвина и его 4'-спиртовых

Таблица 18.8

Величины $R_f \times 100$ антибиотиков, входящих в гентамициновый комплекс

Антибиотик	Растворитель ^a		
	X	Y	Z
A ₁	10		
A	16	60	18
B	22		
X	28		
B ₁	40		
C ₁ ^b		71	54
C ₂ ^b		76	58
D ^b		69	42

^a X — хлороформ—метанол—28 %-ный гидроксид аммония (1:1:1) [83]; Y — хлороформ—метанол—28 %-ный гидроксид аммония—вода (1:4:2:1) [82]; Z — хлороформ—метанол—28 %-ный гидроксид аммония (2:1:1) [82].

^b Основной компонент, D = C_{1a}.

ленхлорид—метанол (17:3). Перечисленным фракциям соответствуют следующие величины R_f : 0,7; 0,6; 0,5 и 0,8.

Нифимицин удалось разделить на четыре компонента A₁ и A₂, B₁ и B₂ методом двойного элюирования смесью этилацетат—этанол—вода (150:45:28) на слоях силикагеля GF. Вариамицин анализировали на слоях кремневой кислоты, применяя смесь метанол—хлороформ (9:1) [94]. Количественное определение проводят, измеряя коэффициент поглощения элюата при 280 нм. Клиндамицин и его метаболиты сульфоксид-клиндамицин, N-деметилклиндамицин и сульфоксид-N-деметилклиндамицин хроматографировали на листах со слоем силикагеля 6061 (фирма Eastman) смесью ацетон—метилэтилкетон—вода (20,1:72,1:7,8) [95]. Пятна обнаруживали и детектировали методом биоавтографии. Методика биоавтографического детектирования описана в гл. XI, разд. 5. Азалос и др. [3] приводят перечень микроорганизмов для детектирования 84 антибиотиков.

производных в плазме. Разделение проводили на силикагеле, содержащем 6,7 % коллоидного оксида алюминия (бемит) (Du Pont); элюентом служила смесь безводных эфира и ацетона (3:2). Антибиотики экстрагировали из плазмы эфиром. Каднер и др. [91] использовали смесь силикагель G—нейтральный оксид алюминия с активностью I (30:2); после разделения соединения элюировали и измеряли интенсивность флуоресценции при 385 нм при длине возбуждающего излучения 365 нм.

Бержи и Эбле [92] разделили комплексы филипина на четыре фракции: филипин II, филипин III, филипин IV и комплекс филипина I; последняя фракция представляет собой смесь по крайней мере пяти компонентов. Разделение проводили на силикагеле HF, забуференном смесью 0,2 М растворов одно- и двузамещенного фосфата натрия, с применением смеси мети-

Таблица 18.9

Величины $R_f \times 100$ патулина, полученные на силикагеле с различными растворителями

Растворитель	Данные работ				
	[86]	[87]	[88]	[89]	[85]
Этанол—вода (4:1)	71	76			
Толуол—этилацетат—90 %-ная муравьиная кислота (6:3:1)	37		41		
Бензол—метанол—уксусная кислота (24:2:1)	13		21		
Бензол—пропионовая кислота—вода (2:2:1)	64			66	
Хлороформ	4				
Толуол—этилацетат—90 %-ная муравьиная кислота (5:4:1)					5

ЛИТЕРАТУРА

1. Ikekawa T., Iwami F., Akita E., Umezawa H., J. Antibiot. (Tokyo), Ser. A., 16, 56 (1963).
2. Ito Y., Namba M., Naghama N., Yamaguchi T., Okuda T., J. Antibiot. (Tokyo), Ser. A, 17, 218 (1964).
3. Aszalos A., Davis S., Frost D., J. Chromatogr., 37, 487 (1968).
- 3a. Issaq H. J., Barr E. W., Wei T., Meyers C., Aszalos A., J. Chromatogr., 133, 291 (1977).
4. Paris R., Theallet J. P., Ann. Pharm. Fr., 20, 436 (1962).
5. Schmitt J. P., Mathis C., Ann. Pharm. Fr., 23, 205 (1970).
6. Wayland L. G., Weiss P. J., J. Pharm. Sci., 57, 806 (1968).
7. Huettenrauch R., Schulze J., Die Pharmazie, 19, 334 (1964).
8. Brenner M., Niederwieser A., Experientia, 17, 237 (1961).
9. Zuidweg M. H. J., Oostendorp J. G., Bos C. J. K., J. Chromatogr., 42, 552 (1969).
10. Wagman G. H., Weinstein M. J., Chromatography of Antibiotics, Elsevier, Amsterdam, 1973.
- 10a. Aszalos A., Frost D., "Thin-Layer Chromatography of Antibiotics" in Methods in Enzymology, Vol. 43, Antibiotics, J. H. Hash, Ed., Academic Press, New York, 1975, p. 172.
11. Prelog V., Gold A. M., Talbot G., Zamojski A., Helv. Chim. Acta, 45, 4 (1962).
12. Prelog V., Walser A., Helv. Chim. Acta, 45, 631 (1962).
13. Beck J., Gerlach H., Prelog V., Voser W., Helv. Chim. Acta, 45, 620 (1962).
14. Bickel H., Gaeumann E., Huetter R., Sackmann W., Viseher E., Voser W., Wettstein A., Zaehner H., Helv. Chim. Acta, 45, 1396 (1962).
15. Cassani G., Albertini A., Ciferri O., J. Chromatogr., 13, 238 (1964).

- 16 Kondo S, Sezaki M, Shimura M, Penishirin Sono Ta Koseibusshitsu 17, 1 (1964), through Chem Abstr, 61, 4681 (1964)
- 17 Nussbaumer P A, Schorderet M, Pharm Acta Helv, 40, 205 (1965)
- 18 Katayama T Ikeda H, Sci Pap Inst Phys Chem Res Tokyo 63, 49 (1969)
- 19 Sato T, Ikeda H Sci Pap Inst Phys Chem Res Tokyo, 59, 159 (1965)
- 20 Voigt R, Maa Bared A G, J Chromatogr, 36, 120 (1968)
- 21 Borołwiecka B, Diss Pharm Pharmacol, 22, 345 (1970)
- 22 Keller-Schierlein W, Roncarì G, Helv Chim Acta, 45, 138 (1962)
- 23 Anderson T T, J Chromatogr, 14, 127 (1964)
- 24 Malczewska-Konecka W, Pikarska Z, Kowszyk-Gundife Z, Chem Anal (Warsaw), 14, 1093 (1969), through Anal Abstr, 19, 4345 (1970)
- 25 Richard G Radecka C, Hughes D W, Wilson W L, J Chromatogr, 67, 69 (1972)
- 26 Radecka C Wilson W L, Hughes D W, J Pharm Sci, 61, 430 (1972)
- 27 Meyers E, Smith D A, J Chromatogr, 14, 129 (1964)
- 28 Easterbrook S M, Hersey J A, J Chromatogr, 121, 390 (1976)
- 29 Brodasky T F Anal Chem, 343 (1963)
- 30 Deshmukh P V, Mehta S I Vaidya M G, Hindustan Antibiot Bull 12, 68 (1969), through Chem Abstr, 73, 69890q (1970)
- 31 Vickers C, J Pharm Pharmacol, Suppl 18 17 (1966)
- 32 Stretton R J, Carr J P, Watson-Walker J, J Chromatogr, 45, 155 (1969)
- 33 Pitton J S, Antibiot Advan Res, Prod Clin Use Proc Congr, Prague, 1964, 49 (Pub 1965)
- 34 Nussbaumer P A, Pharm Acta Helv, 37, 65 (1962)
- 35 Nussbaumer P A, Pharm Acta Helv, 37, 161 (1962)
- 36 Nussbaumer P A, Pharm Acta Helv, 38, 245 (1963)
- 37 Nussbaumer P A, Pharm Acta Helv, 38, 758 (1963)
- 38 Fischer R, Lautner H, Arch Pharm, 294/66, 1 (1961)
- 39 Nicolaus B J R, Coronelli C, Binaghi A, Farmaco Ed Prat, 16, 349 (1961), Chem Abstr, 56, 7428 (1962)
- 40 Nicolaus B J R, Coronelli C, Binaghi A, Experientia, 17, 473 (1961)
- 41 Kline R M, Golab T, J Chromatogr, 18, 409 (1965)
- 42 McGilveray I J, Strickland R D, J Pharm Sci, 56, 77 (1967)
- 43 Biagi G L, Barbaro A M, Gamba M F, Guerra M C, J Chromatogr, 41, 371 (1969)
- 44 Biagi G L, Barbaro A M Guerra M C, J Chromatogr, 51, 548 (1970)
- 45 Auterhoff H, Kienzler H, Dtsch Apoth Ztg 112, 297 (1972)
- 46 Корчагин В Б, Ирова Л И, Тоцашик А О, Панина М А, Жидкова А М, Антибиотики, 17, 316 (1972)
- 47 Корчагин В Б, Серова Л И, Дансытьева С П, Навольнева И Н, Иноземцева И И, Трахтенберг Д М, Котова Н И, Антибиотики, 16, 8 (1971)
- 48 Vandamme J E Voets J P, J Chromatogr, 71, 141 (1972)
- 49 Manni P E, Bourgeois M F, Lipper R A, Blaha J M, Hem S L, J Chromatogr, 85, 177 (1973)
- 50 Sinsheimer J E, Hong D D, Burckhalter J H, J Pharm Sci, 58 1041 (1969)
- 51 Siegler A, Kurtzman C P J Chromatogr, 51, 511 (1970)
- 52 Корчагин В Б, Серова Л И, Дансытьева С П, Навольнева И Н, Иноземцева И И, Трахтенберг Д М, Котова Н И, Антибиотики, 16, 410 (1971)
- 53 Корчагин В Б, Ирова Л И, Дансытьева С П, Сергеева Т Н, Куракина С Р, Струкова И Т, Антибиотики, 16 516 (1971)
- 54 Fechtig V, Peter H Bickel H Vischer E, Helv Chim Acta, 51, 1108 (1968)
- 55 Biagi G L, Barbaro A M, Guerra M C, Gamba M F, J Chromatogr, 44, 195 (1969)
- 56 Buri P, Pharm Acta Helv, 42, 344 (1967)
- 57 Sensi P., Coronelli C, Nicolaus B. J R, J Chromatogr, 5, 519 (1961)
- 58 Kolos O T, Eidus L L, J Chromatogr, 68, 294 (1972)
- 59 Maggi N, Arioli V, Sensi P, J Med Chem, 8, 790 (1965)
- 60 Ascione P P, Zagar J B, Chrekan G P, J Pharm Sci, 56, 1393 (1967).
- 61 Gyanchandani N D, McGilveray I J, Hughes D W, J Pharm Sci, 59, 224 (1970)
- 62 Simmons D L, Woo H S L, Koorengel C M, Seers P, J Pharm Sci, 55, 1313 (1966)
- 63 Dykhuus I C, Brommet M R, J Pharm Sci, 59, 558 (1970)
- 64 Radecka C, Wilson W L, J Chromatogr, 57, 297 (1971)
- 65 Alvarz Fernandez A, Torre Noceda V, Sanchez Carrera E, J Pharm Sci, 58, 443 (1969)
- 66 Van Hoecck G, Kapetanidis L, Mirimanoff A, Pharm Acta Helv, 47, 316 (1972)
- 67 Igloy M, Mizsei A, J Chromatogr, 28, 456 (1967)
- 68 Igloy M, Mizsei A, J Chromatogr, 34, 546 (1968)
- 69 Howlett M R, Selzer G B, J Chromatogr, 30, 630 (1967)
- 70 Haemers A, de Moerloose P, J Chromatogr, 52, 154 (1970)
- 71 Shoji J, J Chromatogr, 26, 306 (1967)
- 72 Studer R O, Lergier W, Vogler K, Helv Chim Acta, 46, 612 (1963)
- 73 Studer R O, Vogler K, Lergier W, Helv Chim Acta, 44, 131 (1961)
- 74 Vogler K, Studer R O, Lergier W, Lanz P, Helv Chim Acta, 43, 1751 (1960)
- 75 Quitt P, Studer R O, Vogler K, Helv. Chim Acta, 46, 1715 (1963)
- 76 Plattner Pl A, Vogler K, Studer R. O., Quitt P, Keller-Schierlein W, Helv Chim Acta, 46, 927 (1963)
- 77 Bergy M E, Eble T. E, Biochemistry, 7, 653 (1968)
- 78 Ochab S, Diss Pharm Pharmacol, 22, 351 (1970), through Chem Abstr, 74, 79732z (1971)
- 79 Marlin J F, McDaniel L. E, J Chromatogr, 104, 151 (1975)
- 80 Borowski E, Falkowski L, Golik J, Zielinski J, Ziminski T, Mechlinski W, Jereczek E, Kolodziejczyk P, Adlercreutz H, Schaffner C P, Neelakan-tan S Tetrahedron Lett, 1971, 1978
- 81 Bird R F, Stevens S G E, Analyst (London), 87, 572 (1967)
- 82 Maehr H, Schaffner C P, J Chromatogr, 30, 572 (1967)
- 83 Wagman G H, Marquez J A, Bailey J V, Cooper D, Weinstein J, Ikach R, Daniels P, J Chromatogr, 70, 171 (1972)
- 84 Wilson W L, Richard G, Hughes D W, J Chromatogr, 78, 442 (1973)
- 85 Scott P M, Kennedy B P C, J Assoc Oif Anal Chem, 56, 813 (1973).
- 86 Reiss J, Chromatographia, 4, 576 (1971)
- 87 Norstadt F A, McCalla T M Science, 140, 410 (1963)
- 88 Scott P M, Lawrence J W, van Walbeck W, Appl Microbiol, 20, 839 (1970)
- 89 Tanenbaum S W, Bassett E W, Biochim Biophys Acta, 28, 21 (1958).
- 90 Fischer L J, Riegelman S, J Chromatogr, 21, 268 (1966)
- 91 Kadner H, Jacobi H, Engel S, Pharmazie 26, 94 (1971)
- 92 Bergy M E, Eble T E, Biochemistry, 7, 653 (1968)
- 93 Againa S, Kalushkova M, Georgieva I, J Chromatogr, 109, 177 (1975)
- 94 Жданович Я В, Локиши Г Б, Петракушина З В, Антибиотики, 19, 687 (1974)
- 95 Brodasky T F, Lewis C, Eble T E, J Chromatogr, 123, 33 (1976)

1. САХАРА

Разделению сахаров и их производных методом ТСХ посвящено чрезвычайно много работ, хотя первые две статьи, в которых упоминалось о возможности разделения углеводов таким методом, были опубликованы только в 1960 г. [1, 2]. Менсфильд [2а], Щерц и др. [2б] и Гебрегцагер и др. [2в] опубликовали обзоры по ТСХ углеводов, а Мокцар и Мокцар [2г] рассмотрели возможность определения методом ТСХ углеводов боковых цепей гликопротеинов. Сахара хроматографировали на самых различных тонких слоях, включая силикат магния, силикат кальция, сульфат кальция, полиамид, сефадекс, слои диоксида кремния, пропитанные комплексобразующими агентами, оксид магния, силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, забуференные слои силикагеля или кизельгура и даже смеси оксидов хрома с целитом. Как видно из табл. 19.1, ни одну систему саму по себе нельзя считать вполне удовлетворительной; часто приходится заменять растворитель, а иногда и растворитель и адсорбент. Пастушка [3] использовал слои силикагеля, пропитанные 0,1 н. раствором борной кислоты, и смеси бензол—уксусная кислота—метанол (1:1:3) и метилэтилкетон—уксусная кислота—метанол (3:1:1) (табл. 19.1). Сахара обнаруживали, опрыскивая пластинку анилинфталатом или смесью (1:1) 20 %-ной серной кислоты и 0,2 %-ного раствора нафторезорцина в этаноле. После опрыскивания пластинки сушили при 105°C. Чувствительность определения составила 4 мкг. Поргес и Поргесова [4], используя чехословацкий силикагель, обработанный соляной кислотой для удаления железа, получили несколько более высокие величины R_f с тем же растворителем [бензол—уксусная кислота—метанол (1:1:3)], который применял и Пастушка. При хроматографировании на этом же адсорбенте элюирование проводили смесями ацетат—изопропанол—уксусная кислота—вода (4:2:1:1) [5] и хлороформ—метанол (6:4) [6]. Дополнительный перечень растворителей приведен в литературе [6—9]. Слои силикагеля, пропитанные 0,2 М боратным буфером (рН 8,0), использовали со смесями *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (5:4:1) [10], *n*-бутанол—вода—уксусная кислота—эфир (3:2:2:1) [11] и

хлороформ—этанол (5:1) или бензол—этанол (10:1) [12]. Рагацци и Веронезе [13] получили хорошие хроматограммы даже в присутствии значительных количеств соли. Эти авторы осуществили хроматографирование на слоях силикагеля, пропитанных 1/15 М фосфатным буфером (рН 8), с двумя смесями *n*-бутанол—ацетон—вода (4:5:1) и *n*-бутанол—диоксан—вода (4:5:1). С этими системами можно анализировать пробы, содержащие от 1 до 200 мкг сахаров. Применяя многократное элюирование смесью метилэтилкетон—уксусная кислота—вода, насыщенной борной кислотой (9:1:1), Ломбард [14] разделил пять сахаров на тех же слоях даже в присутствии кислоты. В работе [15] приведены величины R_f для семи моносахаридов, полученные при хроматографировании их на диоксиде кремния, пропитанном фосфатным буфером различной концентрации. Лато и др. [16] приводят величины R_f для 16 моносахаридов, 7 олигосахаридов и 2 метилпроизводных; хроматографирование велось на слоях, пропитанных фосфатом или ацетатом, с использованием 42 смесей, 23 из которых оказались вполне пригодными. На диоксиде кремния, пропитанном моносодиевым фосфатом, при длине пути разделения 33 см с помощью смеси ацетон—вода—хлороформ—метанол (8:0,5:1:1) можно разделить рафинозу, лактозу, мальтозу, галактозу, сахарозу, левулозу, арабинозу, рибозу и рамнозу. Вайдман и Фишер [17] применяли забуференные ацетатом натрия слои силикагеля для разделения и обнаружения 2-дезоксисахаров, используя для элюирования смесь этилацетат—пропанол-2—вода (12:6:1).

Пиффери [19] удалось отделить сахара от антоцианов и антоцианидинов на слоях силикагеля, пропитанного основным ацетатом свинца, при слабом подкислении раствора пробы.

Котт и др. [20] и Мазера и Каезер [21] для идентификации сахаров мочи и крови применяли забуференные слои диоксида кремния. Мальтозу и глюкозу, особенно при большом содержании мальтозы, разделяли на слоях смеси 50:50 силикагеля и оксида алюминия [21].

Валди [22] использовал слои, приготовленные смешением 20 г кизельгура G с 40 мл фосфатного буферного раствора (равные объемы 0,1 М раствора фосфорной кислоты и 0,1 М раствора динатрийгидрофосфата) и смесь *n*-бутанол—ацетон—фосфатный буферный раствор (4:5:1). Талукдеру [23] удалось отделить фукозу от семи других нейтральных моносахаридов на кизельгуре G, забуференном 0,15 М раствором моносодиевым фосфатом, применяя смесь этилацетат—метанол—*n*-бутанол—вода (16:3:3:2); разделить ксилозу и рибозу в таких условиях не удалось.

Хей и др. [24] хроматографировали обширный ряд сахаров и их производных на слоях непротитанного силикагеля G.

Величины $R_f \times 100$ сахаров в различных системах^а

Сахар	Силикат магнез (Woelm) воздушно-сухой. Камера с ненасыщенной атмос- ферой ^б				Силика- гель G в геле G в	Силикатгель G, приготовленный с 0,1 н. борной кислотой ^б		Кизель- гур б, г	Кислый оксид алюминия б		Кремневая кислота, приготовленная с 1/15 М фосфатным буферным раство- ром, рН 8	Целлюло- за					
	A	B	B	Г		Д	Е		Ж	З			И	К	Л	М	Н
	Д-Глюкоза	66	67	28		42	49		63	42			17	31	24	22	41
Д-Фруктоза	65	52	31	42	51	52	31	25	33	26	26	46	24				
Д-Ксилоза	66	65	36	53	57	59	39	39	40	37	40	58	30				
Л-Ксилоза																	
Д-Рибоза	58	60	34	45	59			49			37	58	39				
Д-Галактоза	62	67	23	34		55	32	18	24	16	16	30	17				
Лактоза	61	61	12	23	9	56	25	4			6	22	4				
Л-Арабиноза	61	65	28	40	57	62	42	28	35	28			29				
Д-Арабиноза	61	65	28	39							28	47	27				
Л-Рамноза	67	65	50	64		67	52	62	58	49	55	72					
Л-Сорбоза	66	55	31	45		51	24	26					23				
Д-Манноза	66	66	32	46	55	58	32	23	36	26	28	49	23				
Мальтоза	59	63	18	30	29			6			12	35	6				
Сахароза	70	56	22	40	25	63	29	8			14	36	10				
Рафиноза	64	43	9	20	13						4	12					
Трегалоза	62	50	20	32													
Д-Ликсоза													33				
Целлобиоза													5				

^а А — *n*-пропанол—вода (5:5) [59]; Б — *n*-пропанол—вода—*n*-пропиламин (5:3:2) [59]; В — *n*-пропанол—вода—хлороформ (6:2:1) [60]; Г — *n*-пропанол—вода—метилэтилкетон (2:1:1) [60]; Д — *n*-бутанол—уксусная кислота—диэтиловый эфир—вода (9:6:3:1) [24]; Е — бензол—уксусная кислота—метанол (1:1:3) [3]; Ж — метилэтилкетон—уксусная кислота—метанол (3:1:1) [3]; З — этилацетат—изопропанол—вода (130:57:23) [27]; И — *n*-бутанол—ацетон—вода (4:5:1) [57]; К — *n*-бутанол—ацетон—вода (7:2:1) [57]; Л — *n*-бутанол—ацетон—вода (4:5:1) [13]; М — *n*-бутанол—диоксан—вода (4:5:1) [13]; Н — муравьиная кислота—метилэтилкетон—трет-бутанол—вода (3:6:8:3) [39].

^б Длина пути разделения 10 см.

^в Высушен при 135°C.

^г Приготовлен с 0,02 М раствором ацетата натрия.

Элюентом при этом служила смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—диэтиловый эфир—вода (9:6:3:1), а обнаруживающим реагентом — концентрированная серная кислота или 0,5 %-ный раствор перманганата калия в 1 н. растворе гидроксида натрия. После опрыскивания пластинки нагревали при 100°C. Кроме величин R_f , приведенных в табл. 19.1, получены также R_f целлобиозы (0,32), изомальтозы (0,16), ламинарибиозы (0,26) и мелибиозы (0,15). Бергельсон и др. [25] исследовали на примере ряда сахаров возможность обнаружения методом ТСХ α -гликолевых группировок с помощью различных реактивов. Разделение на слоях силикагеля проводили четырьмя различными смесями. Величины R_f приведены с учетом пределов обнаружения для четырех различных смесей. Наиболее чувствительным реактивом оказался 5 %-ный раствор нитрата серебра и 25 %-ный раствор гидроксида аммония.

Гарбутт [26] сравнил результаты разделения некоторых углеводов на кизельгуре G, фильтрцелле и гифлосуперцелле (Johns Menvile). Фильтрующие приспособления применяли с сульфатом кальция в качестве связующего. Фильтрцелл и комбинация фильтрцелла с гифлосуперцеллом обеспечивают лучшее разделение моносахаридов, чем кизельгур G или гифлосуперцелл в отдельности. Для разделения использовали смесь *n*-бутанол—пиридин—вода (15:3:2). В работе приведены величины R_f , найденные для глюкозы, мальтозы, ксилозы и двух возможных компонентов — изомальтозы и панозы. Шталь и Кальтенбах [27] провели разделение группы сахаров на слоях кизельгура G, приготовленных с 0,02 М раствором ацетата натрия; элюентом служила смесь этилацетат—изопропанол—вода (130:57:23). Полученные величины R_f даны в табл. 19.1.

Для хроматографирования сахаров применяли также смеси кизельгура и силикагеля; Вассерман и Ханус [28] использовали смесь этих адсорбентов в соотношении 3:2 и элюент изопропанол—этилацетат—вода (27:3,5:1); хроматографирование велось в камере с насыщенной атмосферой. Прей и др. [29, 30] исследовали зависимость величин R_f сахаров на различных смесях кизельгура и силикагеля (в диапазоне от чистого кизельгура до чистого силикагеля), проверяя многочисленные комбинации растворителей на эффективность разделения. Лучшее разделение было достигнуто со смесью силикагель—кизельгур (1:2), пропитанной 2 %-ным раствором поливинилового спирта, и со смесью силикагель—кизельгур (1:4), пропитанной 0,02 М раствором ацетата натрия; лучшими растворителями в сочетании с этими смесями адсорбентов оказались этилацетат—ацетон—вода (20:20:3) и этилацетат—диметилформамид—вода (15:3:1) соответственно. При разделении на слоях, забуференных ацетатом натрия, для опрыскивания применяли 2 %-ный

раствор нафторезорцина в этаноле, содержащий 10 %-ную фосфорную кислоту. Под действием этого реактива пятна кетоз окрашиваются в темно-красный цвет, пятна альдопентоз — в сине-фиолетовый, пятна альдогексоз — в голубой. Реактив нельзя применять со слоями, пропитанными раствором поливинилового спирта, поэтому для опрыскивания в последнем случае используют смесь анилин—дифениламин—фосфорная кислота. Альдопентозы дают при этом серо-зеленые пятна, метилальдопентозы — желто-зеленые, альдогексозы — синеваато-серые, а кетогексозы — красновато-коричневые.

Чтобы разделение было более четким, указанные авторы применяли клинообразные полосы. Разделение глюкозы, фруктозы и сахарозы проводят двумерным хроматографированием [29] на силикагеле G с буферным раствором борной кислоты в одном направлении со смесью метилэтилкетон—уксусная кислота—метанол (3:1:1), в другом — со смесью бутанол—ацетон—вода (4:5:1). Грундшобер и Прей [31] пользовались силикагелем, забуференным 0,1 н. борной кислотой. Эти исследователи изучали методом ТСХ продукты взаимодействия углеводов с олефинами [32] и разработали [33] более быстрый метод анализа сахаров, предусматривающий хроматографирование на слоях смеси силикагеля и кизельгура, нанесенных на пластинки размером 75×75 мм. С увеличением размеров пластинки длительность разделения растет, а на небольших пластинках его можно провести всего за 6—10 мин. Чтобы разделение, осуществляемое этим методом, было хорошим, количество наносимого на пластинку вещества должно быть невелико (0,5—1 мкг).

Вайкер и Бросмер [34] обнаружили, что при хроматографическом анализе сахаров на слоях силикагеля с применением смеси пропанол—гидроксид аммония—вода (6:2:1) образуются гексозамины и другие соединения, реагирующие с реактивом Эльсона—Моргана; вероятно, силикагель катализирует реакции аминирования. Если же элюент содержит пиридин, аминсахара не образуются.

Разделению сахаров на слоях целлюлозы посвящен ряд статей. Бергельсон и др. [35] использовали восходящее хроматографирование с тремя различными смесями: бутанол—пиридин—вода (10:3:3), бутанол—25 %-ный гидроксид аммония—вода (16:1:2) и фенол—бутанол—уксусная кислота—вода (5:5:2:10). Длительность разделения при этом относительно велика: от 7 до 18 ч. Для обнаружения эти авторы применяли анилинфталат, обеспечивающий чувствительность определения в 0,5—1,0 мкг. Швейгер [36] разделил на слоях целлюлозы семь сахаров. Галактозу, глюкозу, маннозу, ксилозу, рибозу и рамнозу разделяли на слоях порошка целлюлозы MN 300 (толщиной 0,25 мм), просушенного при 100°C, элюируя обеими

фракциями смеси этилацетат—пиридин—вода (2:1:2). Чтобы разделение было полным, применяли двукратное элюирование. Маннозу и арабинозу, которые весьма близки по свойствам, можно разделить при повторном хроматографировании с 1 %-ным раствором аммиака в феноле, насыщенном водой. Метше и др. [37] анализировали глюкозу, галактозу, маннозу и арабинозу методом Швейгера. Приведенные величины R_f показывают, что на них влияет толщина слоя.

Грау и Швейгер [38] определяли этим методом вещества, вызывающие набухание (полисахариды) мясных продуктов. Пробу для хроматографирования готовят следующим образом. Гомогенизуют 5 г мяса и, чтобы удалить жир, экстрагируют два или три раза 20 мл петролейного эфира. После извлечения простых сахаров трехкратной экстракцией 20 мл 50 %-ного этанола остаток кипятят 3 ч в 20 мл 5 %-ной серной кислоты. Гидролизат нейтрализуют 2 М раствором гидроксида бария и фильтруют. Десять миллилитров фильтрата упаривают досуха при 30—50°C в вакууме, а остаток растворяют в 1 мл 40 %-ного метанола. Половину этого раствора затем очищают, пропуская через катионнообменную (H^+) колонку, заполненную адсорбентом Meqsk-I; элюентом служит вода. Первые 15 мл элюата упаривают досуха и остаток растворяют в 0,5 мл водного метанола. Этот раствор можно наносить на тонкослойные целлюлозные пластинки.

Фомгоф и Таккер [39], исследуя разделение простых сахаров на слоях целлюлозы 300 MN с девятью различными смесями растворителей, установили, что при элюировании смесью муравьиная кислота—метилэтилкетон—*трет*-бутанол—вода (3:6:8:3) получают более отчетливые пятна и не образуются полоски. Дамонт и др. [40] при разделении олигосахаридов несколько изменили соотношение компонентов в этой смеси (3:5:7:5); предложенный ими состав пригоден также для анализа сахарозы, глюкозы и фруктозы. Вольфром и др. [41] использовали микрокристаллическую целлюлозу авирин (американскую вискозу) со смесями пиридин—этилацетат—уксусная кислота—вода (5:5:1:3) и бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1) для разделения группы из 11 сахаров, а также различных производных сахаров. Линек и др. [42] хроматографировали пентозы на микрокристаллической целлюлозе со смесью этилацетат—пиридин—вода (8:1:1). Эту же смесь применяли авторы работ [43, 44], но при несколько другом соотношении компонентов: 6:3:2 [43] и 2:1:2 [44]. Кемп и Ван Оорт [45] разделили 11 сахаров, используя смесь пиридин—этилацетат—уксусная кислота—вода (8:14:4:5), которую предварительно подкисляли. Петре и др. [46] применяли тройное элюирование смесью вода—уксусная кислота—*трет*-бута-

нол—этилметилкетон (3:3:8:6) для разделения лактозы, мальтозы, сахарозы, галактозы, маннозы, фруктозы, арабинозы, ксилозы, фукозы, рибозы, рамнозы, галактуроновой, глюкуроновой и маннуроновой кислот. Петрович и Канич [47] нашли, что на слоях из рисового крахмала разделение идет плохо; они получили, однако, великолепные результаты как при одномерном, так и при двумерном хроматографировании на слоях целлюлозы.

Лучшее разделение было достигнуто при двумерном разделении со смесью *n*-бутанол—ацетон—диэтиламин—вода (10:10:2:5) в одном направлении и со смесью фенол—вода (3:1) в атмосфере 25 %-ного аммиака в другом направлении; таким способом удалось разделить 12 сахаров. Используя *n*-бутанол, насыщенный смесью вода—трихлорэтилен—95 %-ный этанол (3:1:1), и проводя непрерывное горизонтальное разделение на слоях целлюлозы в В-N-камере, Бергер и Агат [48] сумели разделить моносахариды даже в присутствии больших количеств сахарозы (1:100); полное разделение, однако, потребовало около 19 ч.

В числе прочих адсорбентов, на которых проводилось разделение углеводов, следует назвать гипс, на котором Жданов и др. [49] хроматографировали углеводы, применяя различные смеси хлороформа и метанола. Аффонсо [50] за 30 мин разделил глюкозу, фруктозу, арабинозу, лактозу, ксилозу и маннозу на полосках алебаstra, элюируя пробы смесью ацетон—бутанол—хлороформ—ацетатный буферный раствор, рН 3,6 (5:4:1:1). Гессе и Александер [51] для разделения смеси из 10 сахаров применили слои оксида хрома с целитом (6:1). Поскольку этот адсорбент окрашен в темный цвет, по окончании разделения на пластинки наносили (опрыскиванием) тонкий слой кремневой кислоты, а затем опрыскивали обнаруживающим реагентом—анилинфталатом и нагревали 15 мин при 110°C. Были испробованы слои графита, однако задние границы пятен на графите размывались. Бикофер и др. [52] анализировали смесь гексоз и пентоз на слое, состоявшем из кизельгура G (6 г), оксида алюминия G (1 г) и полиакрилонитрила (5 г), смоченном 0,02 М раствором бифосфата натрия. Обнаруживающим реагентом служила смесь *n*-амиловый спирт—изопропанол—этилацетат—вода (11:3:22:6). Для разделения мальто- и меглосахаридов [53, 54] применяли смеси силикагель—кизельгур (3:1). Для разделения полимеров по молекулярным массам использовали *n*-бутанол, этанол и воду (5:3:2) и *n*-пропанол, этанол и воду в различных соотношениях.

Марэ [55] провел хроматографический анализ девяти сахаров на слоях полиамида, элюируя их смесью этилформиат—

метанол (8:1). В данном случае оказалось необходимым тщательно контролировать температуру. Грейф и Энгельгардт [56] исследовали разделение сахаров на шести коммерческих образцах полиамида, применяя смесь бутанол—ацетон—вода—уксусная кислота (6:2:1:1). При двумерном хроматографировании вторым растворителем служила смесь метилэтилкетон—ацетон—метанол—уксусная кислота—триметилборат (16:1:2:2:2).

Штро и др. [57] разделили ряд сахаров на кислом оксиде алюминия с двумя растворителями (табл. 19.1). Кочетков и др. [58] анализировали моносахариды на оксиде алюминия.

Грассгоф [59, 60] описал разделение сахаров на силикате магния с четырьмя различными смесями (табл. 19.1). Добавление первичного амина в растворитель уменьшает величины R_f кетоз и не меняет или увеличивает R_f альдоз. При использовании смеси, содержащей *n*-пропиламин, необходимо полностью удалить амин, чтобы избежать осложнений с реакциями окрашивания. Для этого требуется проводить сушку около 2 ч на воздухе и 1 ч при 130°C. Торе [61] провел разделение на силикате кальция; лучший результат был получен со смесями *n*-бутанол—вода и *n*-бутанол—бутилацетат—вода. Этот автор использовал забуференные и незабуференные слои; в первом случае 11 г силиката кальция (Silene EF) смешивали с 3 г целита 535 и 700 мг ацетата натрия. Эти забуференные пластинки сушили 20 ч при 110°C. Хорошее разделение было получено при многократном (8-кратном) элюировании при длине пути разделения 16,9 см.

Де Соуза и Панек [62] пользовались ТСХ на пластинках кизельгура G, изучая гидролиз крахмала под действием α - и β -амилаз. Пробы отбирали каждые 5 мин, и увеличение содержания восстановленных сахаров легко было проследить. Под действием α -амилазы образуются глюкоза, декстрины и мальтоза, тогда как β -амилаза способствует образованию только глюкозы и мальтозы.

Для улучшения разделения углеводов пользуются двумерной ТСХ. На слоях силикагеля в одном направлении разделение проводят смесью хлороформ—метанол—вода (16:9:2), а в другом [63] — смесью этилацетат—метанол—уксусная кислота—вода (6:3:3:2); можно также дважды элюировать пробу смесью бутанол—этанол—вода (5:1:4) и затем при 90°C смесью бутанол—уксусная кислота—эфир—вода (9:6:3:1) [64]. При двумерном разделении успешно применяют также пропитанные слои. На слоях силикагеля и кизельгура, пропитанных солями борной кислоты, разделение проводят смесями изобутанол—уксусная кислота—вода (5:4:1) в одном направлении и *n*-пропанол—вода (8,5:1,5) или *n*-пропанол—диметил-

сульфоксид—вода (8,6:0,5:0,9) в другом направлении [65]. При двумерном хроматографировании слои силикагеля пропитывают борной кислотой, элюентами при этом служат изопропанол—вода (4:1) и *n*-бутанол—этилацетат—изопропанол—уксусная кислота—вода (7:20:12:7:6), а также другие комбинации растворителей. Мещетти и др. [66] исследовали большое число веществ, применяемых для пропитки двойных слоев силикагеля, предназначенных для анализа углеводов. Лучшими комбинациями оказались следующие. а) Слой А — силикагель, пропитанный смесью равных объемов 0,132 М раствора тетрабората натрия, 0,204 М раствора борной кислоты и 0,06 М раствора вольфрамата натрия; слой В — силикагель, пропитанный 0,036 М раствором борной кислоты. Разделение на таком двойном слое проводилось смесью изопропанол—*n*-пропанол—вода (14:14:5) в первом направлении, вдоль слоя А, и смесью этилацетат—уксусная кислота—метанол—вода (12:3:3:2) или *n*-бутанол—этилацетат—изопропанол—уксусная кислота—вода (7:20:12:7:6) под прямым углом к слою В. б) Слой В — силикагель, пропитанный 0,24 М раствором ацетата натрия, и слой А в качестве двойного слоя со смесью ацетон—вода (9:1) для слоя В и смесью метилацетат—изопропанол—вода (2:2:1) для слоя А. Авторы приводят дополнительные комбинации, обеспечивающие хорошее разделение.

В работах по анализу олигосахаридов содержатся сведения и о разделении сахаров, а ряд работ посвящен только этому вопросу. Спичан [67] разделил сахара, образующиеся при гидролизе крахмала на целлюлозе MN 300 свежеприготовленной смесью уксусная кислота—этилацетат—пиридин—вода (1:7:5:3). Чтобы удалить соли, вызывающие размывание границ зон, Спичан экстрагировал смесь гидролизатов, высушенную при температуре ниже 0°C, пиридином, растворяющим сахара. Дамонт и др. [40] также хроматографировали олигосахариды на целлюлозе и обнаружили, что лучший растворитель — это смесь уксусная кислота—метилэтилкетон—*трет*-бутанол—вода (3:5:7:5); эту смесь они использовали для трехкратного разделения.

Для разделения олигосахаридов, как и для разделения простых сахаров, весьма подходящим адсорбентом является силикагель. Повинг и Ирцикевич [68] проводили элюирование смесями *n*-пропанола, изопропанола, воды, аммиака, *трет*-бутанола, *n*-бутанола, изоамилового спирта и этанола, взятых в различных соотношениях, в камере для разделения с ненасыщенной атмосферой. Лучшим элюентом для многократного разделения оказалась смесь *n*-пропанол—вода—аммиак (70:30:1); с помощью этой смеси удалось разделить гексасахариды и можно анализировать октасахариды. Целлоолигосахариды,

включая целлогексозу, хроматографировали в камерах с насыщенной атмосферой, используя смесь изопропанол—вода—этилацетат (1:2:1) [69]. Обнаружение проводилось реактивом Т-23. Гансен [70] установил, что почти все моносахариды движутся впереди молочной кислоты, если ввести ее в систему растворителей. Это обстоятельство обеспечивает более эффективное разделение олигосахаридов. Используемая автором [70] смесь состояла из изопропанола, ацетона и 1 М молочной кислоты (4:4:2).

Для разделения олигосахаридов применяли также забуференные слои силикагеля. На слоях силикагеля, приготовленных на смеси (1:1) 0,2 М раствора ортофосфорной кислоты и 0,05 М раствора вольфрамата натрия, элюирование проводили дважды смесью изопропанол—этилацетат—вода (2:2:1), а затем в перпендикулярном первому направлению смесью бутанол—пиридин—вода (8:4:3); таким способом удалось разделить группу из 9 олигосахаридов [71].

Оводов и др. [15] исследовали разделение 5 олигосахаридов на слоях, пропитанных растворами моно- и дигидрофосфата натрия различной концентрации, с четырьмя различными системами растворителей. Миццетти и др. [72] нашли, что пропитка борной кислотой не всегда обеспечивает селективное разделение олигосахаридов; в сочетании с силикагелями, пропитанными растворами вольфрамов и молибденовой кислоты различных концентраций при различных значениях рН, было опробовано 107 систем растворителей. Лучшие результаты были получены для слоев с низкими значениями рН, пропитанными смесью фосфорная кислота—вольфрамат натрия либо насыщенной молибденовой кислотой. Пропитка молибденовой кислотой обеспечивает получение хроматограмм с более высоким разрешением, чем пропитка фосфовольфрамовой кислотой; в последнем случае удается достичь лучшего разделения при двумерном хроматографировании. Лучшее разделение (5 моно-+9 олигосахаридов) получено при двукратном элюировании смесью этилацетат—изопропанол—вода (10:6:3) на слоях, пропитанных молибденовой кислотой.

Коллинз и Чандоркар [73], определяя олигофруктозы в цикории, использовали смеси *n*-пропанол—этилацетат—вода с различным соотношением компонентов в зависимости от степени полимеризации (СП) при разделении на кизельгуре G. Как оказалось, соотношение 4:5:1 предпочтительно при СП в пределах от 7 до 8, для гомологов с СП от 2 до 20 лучшие результаты дает смесь с соотношением компонентов 6:2:2.

Глицерин широко применяется в качестве консерванта сахаридов в биологических жидкостях, поэтому Шеллард и Жоллиф [73а] исследовали влияние этого соединения на скорость

применения простых сахаров на слоях силикагеля и целлюлозы. В присутствии глицерина забуференные слои силикагеля предпочтительнее слоев целлюлозы; кроме того, рекомендуется разбавлять пробы перед хроматографическим анализом до содержания глицерина 10—20 %.

2. ПРОИЗВОДНЫЕ САХАРОВ

Фенилгидразоны, озазоны и родственные соединения

Штро и др. [57] изучали разделение не только сахаров, но и фенилгидразонов сахаров на кислых слоях оксида алюминия, применяя ряд растворителей (табл. 19.2). Для обнаружения этих соединений слои опрыскивали раствором *n*-метоксибензальдегид—серная кислота—этанол (1:1:18). После 2—3-минутного нагревания при 110°C появляются желто-зеленые пятна. Ринк и Герман [74] использовали разделение фенилозазонов с целью разделения и идентификации сахаров в моче. Получают производные следующим образом. К пробе мочи (10 мл) прибавляют 0,4 г гидрохлорида фенилгидразина и 0,6 г ацетата натрия и нагревают 30 мин на кипящей водяной бане. Образовавшийся кристаллический продукт охлаждают и промывают водой, после чего растворяют в смеси диоксан—метанол (1:1). Чтобы приготовить тонкие слои, смешивают 30 г кизельгура G с 60 мл 0,05 М раствора тетрабората натрия, полученную суспензию распределяют по пластинке, а затем сушат 30 мин при 80°C. Разделение проводят смесью хлороформ—диоксан—тетрагидрофуран—0,1 М раствор тетрабората натрия (40:20:20:1,5). Полученные значения R_f приведены в табл. 19.2. Чтобы сохранить расположение пятен, их размечают сразу после сушки, поскольку желтая окраска озазонов исчезает очень быстро. Торе [75] провел разделение фенилозазонов на силикате кальция (Silene EF) с двумя растворителями (табл. 19.2). Хаас и Зелигер [76] разделили группу этих производных на слоях полиамида, элюируя их смесью диметилформамид—бензол (3:97); длина пути разделения составляла 14 см. Производные олигосахаридов отделяли от производных моносахаридов с помощью смеси пиридин—вода (3:17). При опрыскивании свежеприготовленным раствором диазотированной сульфаниловой кислоты в 2 н. растворе карбоната натрия на хроматограмме появляются коричневые или красновато-коричневые пятна.

Апплегарт и др. [77] проводили хроматографический анализ группы *n*-бромфенилозазонов на силикагеле со смесью бензол—метанол (9:1). Озазоны имеют следующие ориентирующие

Таблица 19.2

Величины $R_f \times 100$ некоторых производных сахаров в различных системах^а

Сахара	Фенилгидразоны		Фенилозазоны		
	Кислый оксид алюминия ^б [57]		Кизельгур G ^в [74]	Силен EF ^г [75]	
	А	Б		Г	Д
Арабиноза	75	63	91	65	
Ксилоза	77	68	72		
Галактоза	69	61	52	29	
Манноза	71	62			
Глюкоза	68	64	39	22	
Рамноза	83	76		78	
Фруктоза			39		
Лактоза			2		50
Сорбоза			21		
Рибоза			91		
Мальтоза			12		57
Целлобиоза					57

^а А — бутанол—ацетон—вода (4:5:1); Б — бутанол—ацетон—вода (7:2:1); В — хлороформ—диоксан—тетрагидрофуран—0,1 М раствор тетрабората натрия (40:20:20:1,5); Г — хлороформ—ацетон—95 %-ный этанол (5:3:3); Д — хлороформ—ацетон—этанол—вода (10:10:6:1).

^б Длина пути разделения 10 см.

^в Приготовлен с 0,05 н. раствором тетрабората натрия. Сушат 30 мин при 80°C. Длина пути разделения 10 см.

^г Гидратированный силикат кальция. Сушат 24 ч при 110°C.

величины R_f : пентозы 0,10; гексозы 0,04; монометилпентозы 0,24; монометилгексозы 0,18 и диметилпентозы 0,29.

Меркаптали сахаров удалось разделить на силикагеле G со смесью бензол—этанол (20:3). Обнаружение осуществляли раствором *n*-анизидин·HCl в 5 мл серной кислоты и 100 мл бутанола [78].

Сложные эфиры

Методом ТСХ осуществляется также анализ сложных эфиров сахаров, в том числе ацетатов, бензоатов и эфиров жирных кислот. Большинство анализов проведено на слоях силикагеля.

Эфиры сахарозы и жирных кислот хроматографировали Линоу и др. [79], Ренни [80], Вейсс и др. [81], Сахарабудхе и Чадха [82] и Киношита [83, 84]. В пробе пальмитата сахарозы при элюировании смесью бензол—этанол (3:1) найдено 11 компонентов. Киношита исследовал большое число растворителей с тем, чтобы выявить пригодность их для разделения указанных веществ; лучшими из них оказались смеси метанол—хлороформ—уксусная кислота (3:16:1 и 1:8:1) и метанол—хлороформ—уксусная кислота—вода (5:40:4:1). Ги [85] применял узкие хроматографические полоски Кирхнера и др. [86], на которые наносил силикагель с 5 % крахмала. Лучшее разделение из числа опробованных растворителей обеспечивает смесь толуол—этилацетат—95 %-ный этанол (2:1:1). Для обнаружения слои опрыскивали 0,2 %-ным раствором дихлорфлуоресцеина в 95 %-ном этаноле. Последний растворитель применяли также при количественном анализе пальмитатов сахарозы [81]. Низкомолекулярные сложные эфиры (моно, ди, три и тетра) легче разделить методом двумерной ТСХ смесью хлороформ—метанол (4:1); этот метод, однако, непригоден для количественного анализа. Высшие сложные эфиры можно разделить смесью петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (75:25:1). Когда количественное определение проводится методом денситометрии, сложные эфиры обнаруживают реактивом Т-270; чувствительность при этом составляет примерно 0,3 мкг. Авторы работы [82] разделили эфиры сорбита и жирных кислот на силикагеле, пропитанном 4 %-ным раствором борной кислоты, элюируя пробу смесью бензол—диэтиловый эфир—метанол (15:4:1).

В ряде работ [24, 87—91] описано разделение ацетилированных сахаров на слоях силикагеля. Дюмазер и др. [89] проводили хроматографирование смесью бензол—этанол (95:5) на слоях силикагеля G, которые предварительно сушили 30 мин при 140°C, и получили следующие величины R_f (по отношению к пентаацетату глюкозы): октаацетат мальтозы 0,75; октаацетат сахарозы 0,60; октаацетат лактозы 0,56 и октаацетат целлобиозы 0,40. Были исследованы также ацетилпроизводные ряда сахаров. Мичил и Берендс [90] элюировали пробы смесью циклогексан—изопропиловый эфир—пиридин (4:4:2) и получили следующие величины R_f на силикагеле: α -октаацетиллактоза 0,30; 2,3,4,6-тетраацетил-D-глюкоза 0,39; β -октаацетилмальтоза 0,43; β -тетраацетил-D-ксилоза 0,69; гексаацетил-D-ксилоза 0,54; α -пентаацетил-D-альтроза 0,55; α -пентаацетил-D-глюкоза 0,68. Пятна этих соединений обнаруживали обугливанием концентрированной серной кислотой при 110°C. Тейт и Бишоп [91] для разделения некоторых ацетатов сахара использовали растворы метанола в бензоле. Концентрацию метанола меняли

в пределах от 2 до 10 % в зависимости от природы исследуемых соединений. Для элюирования неполярных низкомолекулярных ацетатов достаточно всего 2 % метанола, а для элюирования полностью ацелированных аминсахаров необходима более высокая концентрация метанола — до 10 %. Детектирование ацетатов осуществляют реактивом Т-144. При такой обработке ацетаты дают темно-пурпурные пятна на желтом фоне. Хей и др. [24] анализировали производные сахаров, включая ацетаты, на слоях силикагеля; Деферрари и др. [88] для разделения производных сахаров подобного типа применяли кремневую кислоту Маллинокродта с крахмалом в качестве связующего. Величины R_f ряда ацетатов, полученные этими двумя группами исследователей, приведены в табл. 19.3. Деферрари и сотрудники обнаруживали ацелированные производные сахаров реактивом Каденаса и Деферрари [92], представляющим собой смесь нитрата серебра, аммиака и метилата натрия. Дюмазер и др. [87] анализировали ацетаты на слоях силикагеля G, высушенных в течение 30 мин при 140°C, используя смесь бензол—этанол (95:5). Если принять за единицу значение R_{st} пентаацетилглюкозы, то октаацетилпроизводным мальтозы, сахарозы, лактозы и целлобиозы соответствуют следующие величины R_{st} : 0,75; 0,60; 0,56 и 0,40. При опрыскивании гидроксилминовым реактивом можно обнаружить до 5 мкг ацетатов.

Деферрари и др. [88] разделили также группу бензоилпроизводных сахаров. Элюирование на слоях кремневой кислоты, связанной крахмалом, проводилось хлороформом и бензолом (3:7), 0,5 %-ным раствором метанола в бензоле, а также этилацетатом и бензолом (4:6 и 3:97). Интересно отметить, что величины R_f аномерных ацетатов отличаются на небольшую величину, тогда как R_f аномерных бензоатов сильно различаются.

Хей и др. [24] приводят ряд величин R_f для ацеталь- и меркапталпроизводных сахаров и полиолов, разделенных на те же системах, что и ацетаты.

Вольфром и др. [93] разделили некоторые ацетаты на тонких слоях магнезола (силикат магния), который, как принято считать (см. гл. II, разд. 2), образует нейтральный продукт. Элюентом в данном случае служила смесь этилацетат—бензол (1:1), длина пути элюирования составляла 15—17 см.

Фосфаты гексозы и трозы анализировали на порошке целлюлозы методом двумерной ТСХ [94]. Лучшее разделение было достигнуто на порошке целлюлозы MN 300. Образцы, нанесенные на пластинки, сушили 2 ч при 105°C, после чего элюировали в том направлении, в котором наносили суспензию адсорбента в органической фазе. Элюирование проводили

Таблица 19.3

Величины $R_f \times 100$ некоторых ацетилпроизводных сахаров

Ацетилпроизводные сахаров	Кремневая кислота Маллинокродта + 10 % крахмала ^a [88]		Силикагель G ^b [24]	
	этилацетат—бензол (3:7)	метанол—бензол (2:98)	верхняя фаза смеси бензол—этанол—вода—гидроксид аммония (200:47:15:1)	<i>n</i> -бутанол—уксусная кислота—диэтиловый эфир—вода (9:6:3:1)
Пента-О-ацетил- α -D-галактопираноза	65			
Пента-О-ацетил- α -D-галактофураноза	52			
Пента-О-ацетил-β-D-галактопираноза	56		81	77
Пента-О-ацетил- β -D-галактофураноза	49			
Пента-О-ацетил-β-D-глюкопираноза	68	63	81	79
Пента-О-ацетил- β -D-маннопираноза	57	52		
Пента-О-ацетил- α -D-глюкопираноза	66		82	79
Тетра-О-ацетил- α -D-ликсопираноза	78	74		
Тетра-О-ацетил- β -D-ксилопираноза	71	69	84	84
Гекса-О-ацетилксилобиоза			72	84
Окта-О-ацетил- α -мальтоза			79	85
Окта-О-ацетил- β -целлобиоза			64	84
Окта-О-ацетил- β -ламинарибиоза			62	81
Окта-О-ацетилсахароза			63	77
Окта-О-ацетилгенциобиоза	27	22		

^a Сушат 2 ч при 110°C; длина пути разделения 13 см.

^b Сушат 12 ч при 135°C.

смесью 60 мл *трет*-амилового спирта и 30 мл воды, содержащей 2 г *n*-толуолсульфокислоты. Разделение длится от 6 до 8 ч, длина пути элюирования составляет 18 см. По окончании элюирования пластинки сушили 12 ч на воздухе при комнатной температуре. Второе разделение (под прямым углом к первому) проводили смесью изомасляная кислота—концентрированный гидроксид аммония—вода (66:1:33). Для обнаружения веществ применяли три последовательных опрыскивания.

Сначала опрыскивали реактивом Т-194. После высушивания пластинки опрыскивали реактивом Т-15 и нагревали 5—8 мин при 110—120°C. Нагревание прекращали, когда края целлюлозного слоя начинали обугливаться; еще теплые пластинки опрыскивали реактивом Т-247. Появляющиеся при такой обработке пятна окрашены по-разному, но в процессе сушки пластинок фон становится бледно-фиолетовым и различие уменьшается. После опрыскивания концентрированным гидроксидом аммония пятна становятся темно-синими, фон остается светлым. Хотя описанным способом разделить фосфаты довольно легко, 3- и 2-фосфоглицериновые кислоты разделить таким образом не удалось. Грассетти и др. [95] для разделения фосфатов сахаров предложили слой целлюлозы и смесь ацетон—ацетонитрил—1 н. соляная кислота (32:13:5).

Дитрих и др. [96] разделили группу фосфатов сахаров на слоях ЕСТЕОЛА, которые готовили взмучиванием 2 г просеянного целлюлозного порошка ЕСТЕОЛА в 18 мл 0,004 М раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты, рН 7,0. После 12-часового высушивания пластинок при комнатной температуре их опрыскивали 0,1 М раствором тетрабората аммония и высушивали. Фосфаты сахаров элюировали смесью 95 %-ный этанол—0,1 М тетраборат аммония, рН 9,0 (3:2), и этой же смесью при рН 10 (в последнем случае пластинки опрыскивали буфером с тем же значением рН). Длина пути элюирования составляла 17 см. Обнаружение пятен осуществляли, последовательно опрыскивая пластинки смесью бензидин—трихлоруксусная кислота и реактивом на основе молибдата.

Простые эфиры

Прей и др. [97] исследовали ряд смесей-элюентов и условия разделения метиловых эфиров и обнаружили, что 1-, 3- и 6-О-метилфруктозы не удается разделить на слоях силикагеля G со смесью бутанол—ацетон—вода (4:5:1) или этанол—ацетон—вода (4:5:1). Однако эти соединения прекрасно хроматографируются первой из смесей на слое силикагеля G, забуференного 0,1 н. борной кислотой (табл. 19.4). Чеше и Вульф [98] и Хей и др. [24] анализировали некоторые метиловые эфиры на слоях силикагеля G, применяя различные растворители (табл. 19.4). Многократное элюирование улучшает разделение.

Вольфром и др. [93] приводят величины R_f группы 9-О-метилпроизводных сахаров, полученные на магнезоле со смесью метанол—бензол (7:93), и R_f другой группы метилпроизводных [41], полученные на слоях микрокристаллической целлюлозы со смесью бутанон—водный азеотроп. Ги [99] провел хроматографический анализ группы метилированных сахаров

Таблица 19.4

Величины $R_f \times 100$ некоторых О-метиловых эфиров сахаров

Простые эфиры сахаров	Силикагель G			Силикагель, приготовленный с 0,1 н. борной кислотой
	верхняя фаза смеси бензол—этанол—вода—гидроксид аммония (0,8 г/см ³) (200:47:15:1) [24]	диизопропиловый эфирмет—манол (5:1) [98]	n-бутанол—ацетон—вода (4:5:1) [97]	
2-О-Метилглюкоза			72	
3-О-Метилглюкоза			72	
6-О-Метилглюкоза			64	
1-О-Метилфруктоза				33
3-О-Метилфруктоза				54
6-О-Метилфруктоза				70
2,3-Ди-О-Метил-D-ксилоза	15			
2,3,4-Три-О-метил-D-ксилоза	28	50		
2,4-Ди-О-метил-D-глюкоза	5			
2,6-Ди-О-метил-D-глюкоза	5			
4,6-Ди-О-метил-D-глюкоза			11	
2,3,4-Три-О-метил-D-глюкоза			34	
3,4,6-Три-О-Метил-D-глюкоза			27	
2,3,6-Три-О-метил-D-глюкоза	18		25	
2,4,6-Три-О-метил-D-глюкоза	13		23	
2,3,6-Три-О-метил-D-галактоза			21	
2,3,4-Три-О-метил-D-галактоза			16	
2,4,6-Три-О-метил-D-галактоза	17		20	
2,3,4,6-Тетра-О-метил-D-глюкоза	38		45	
2,3,4,6-Тетра-О-метил-D-галактоза			33	

на силикагеле, применяя смеси эфир—толуол (2:1) или метилэтилкетон—толуол (1:1). Метилированные гексозы хроматографически разделяли на силикагеле, элюируя смесью хлороформ—вода—аммиак (500:6:3) [100]. Мид и Ли [101] анализировали метиловые эфиры D-арабинозы на слоях силикагеля, используя бутанон-2, насыщенный 3 %-ным раствором гидроксида аммония.

Обнаружение этих соединений можно проводить с помощью ряда реактивов: анилингидрофталата или хлорсульфоновой кислоты, растворенной в уксусной кислоте (1:2) [98], 0,5 %-ного раствора перманганата калия в 1 н. растворе гидроксида натрия (с последующим нагреванием), обугливанием серной кислотой [24] или реактива, предложенного Преером [97], представляющим собой смесь нафторезорцина и фосфорной кислоты.

Преер и др. [97], Хей и др. [24] и Моды и др. [102] приводят величины R_f изопронилиденных производных, полученных при хроматографическом анализе на силикагеле.

Тейт и Бишоп [103] использовали смесь петролейный эфир (65—110°C) — метанол (95:5) для разделения бензилпроизводных сахаров на силикагеле. Перед проведением анализа исследуемые соединения очищали методом препаративной ТСХ, а чтобы повысить степень разделения, проводили многократное элюирование.

Лерфельд [104] и Каеркайнен и др. [105] хроматографировали триметилсилиловые (ТМС) эфиры некоторых сахаров на силикагеле. При элюировании этилацетатом удается отделить производные аминсахаров от других ТМС-производных, а при элюировании смесью этилацетат—уксусная кислота—гексан (12:1:87) удается отделить нейтральные производные сахара от соответствующих аминсахаров и производных мочевиной кислоты.

Аминосакхара

Анализ аминсахаров проводят на слоях целлюлозы. Гентер и Швайгер [106] разделяли глюкозамин, галактозамин и соответствующие N-ацетилпроизводные. Для разделения всех четырех соединений применяли двумерное хроматографирование с многократным ($\times 2$) элюированием в одном направлении смесью пиридин—этилацетат—уксусная кислота—вода (5:6:1:3) или этанол—пентанол—аммиак—вода (8:2:2:1). Пластинки перед элюированием во втором направлении опрыскивали боратным буфером pH 8,0 (опять $\times 2$) и дважды элюировали смесью этилацетат—пиридин—тетрагидрофуран—вода (7:3:2:2) или смесью этилацетат—изопропанол—пиридин—вода в тех же соотношениях. Вольфром и др. [41] описали методику хроматографического анализа группы аминсахаров на тонких слоях микрокристаллической целлюлозы авирин (американская вискоза) со смесью пиридин—этилацетат—уксусная кислота—вода (5:5:1:3).

Аминосакхара можно обнаружить нингидрином; зоны ацетилированных производных становятся видимыми при последовательном опрыскивании смесью нитрат серебра—гидроксид нат-

рия и разбавленным раствором тиосульфата натрия [41]. Метод, предложенный авторами [106], предусматривает опрыскивание сухой хроматограммы 0,1 М раствором иодной кислоты в ацетоне и после 10-минутной выдержки опрыскивание 3,5 %-ным раствором метаарсениата натрия в 1 н. соляной кислоте. Через 2 мин влажную пластинку опрыскивают, кроме того, 0,6 %-ным спиртовым раствором тиобарбитуровой кислоты и сушат 5 мин при 90°C.

Некоторые гликозамины анализировали на силикагеле, пропитанном сульфатом меди, применяя смесь *n*-пропанол—аммиак (4:1) [107].

Ряд N-арилгликозаминов разделили хроматографически на а) силикагеле, б) кизельгуре, в) сульфате кальция и г) синтетическом цеолите X; полученные при этом величины R_f сведены в таблицу [108]. Отчетливые пятна и высокие величины R_f были получены на силикагеле со смесью эфир—толуол (2:1). N-2,4-динитрофенил (ДНФ) производные гексозаминов анализировали на силикагеле, элюируя смесью хлороформ—метанол—уксусная кислота (90:7:3) [109]. Производные дифенилинденосульфонилхлорида (ДИС) и гексозаминов предложены в качестве чувствительных средств обнаружения этих соединений. Производные разделяли на силикагеле, забуференном раствором бората (pH 8,6); элюентом служила смесь хлороформ—этилацетат—метанол—пропионовая кислота (70:40:22,5:0,5) или толуол—этиленхлоргидрин—25 %-ный аммиак (3:5:2) [110]. После удаления элюента пластинки обрабатывали этилатом натрия и рассматривали в УФ-свете (365 нм). Аминосакхара можно обнаружить в количествах до $2 \cdot 10^{-11}$ моль.

Сахарные кислоты

В работе [15] описано разделение мочевых кислот на силикагеле, пропитанном дигидрофосфатом натрия [15]. Лучшие результаты получены на слоях, пропитанных 0,2 М растворами. Элюентом служили смеси *n*-бутанол—этанол—0,1 М раствор фосфорной кислоты (1:10:5) и *n*-бутанол—этанол—0,1 М раствор соляной кислоты (1:10:5). Группу из восьми сахарных кислот и их лактонов анализировали на силикагеле, применяя систему растворителей *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (2:1:1) [24]. Одну из групп этих соединений разделили также на силикагеле, используя смесь ацетон—вода—бензиловый спирт—уксусная кислота (65:26:22:5) [111]. Смесью галактуронозой, гулууронозой и маннууронозой кислот анализировали на кизельгуре, пропитанном буферным 0,1 М раствором дигидрофосфата натрия, с применением в качестве растворителя смеси ацетон—бутанол—0,1 М раствор дигидрофосфата натрия

(8:5:7) [112]. При обнаружении реактивом Т-171 чувствительность определения составляет 0,5 мкг. Глюкуроновую, галактурановую, гулурановую и маннурановую кислоты, лактоны маннурановой и гулурановой кислот разделяли методом двойного элюирования смесью этилацетат—пиридин—вода (2:1:2) на целлюлозе MN 300 HR [113].

3. ДЕКСТРИНЫ

Виденгоф [114] исследовал возможность разделения α - и β -циклодекстринов на микрохроматопластинках. Лучшее разделение было достигнуто на силикагеле G с использованием ступенчатого элюирования. Пробу наносили на пластинку и элюировали сначала смесью *n*-бутанол—уксусная кислота—вода—пиридин—диметилформамид (6:3:1:2:4). Затем пластинку вынимали из камеры, сушили и элюировали при длине пути разделения, равной $\frac{1}{3}$ расстояния, пройденного при первом разделении. Элюентом в данном случае служила смесь *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (6:3:1). Разделение на слоях алусила (смесь равных количеств силикагеля G и оксида алюминия G) дает худшие результаты; пятна не такие четкие, как на силикагеле. Обнаружение зон проводят обугливанием смесью бихромат калия—серная кислота. Такео и др. [115] достигли лучшего разделения циклодекстринов, применив микрокристаллические слои и смесь бутанол—этанол—вода (4:3:3). Димер и Кольбел [116] отделяли декстрины от сахаров хроматографически на слоях силикагеля, элюируя их смесью этанол—ацетон—вода (50:40:9) или на слоях кизельгура, применяя смесь этилацетат—изопропанол—вода (65:23,5:11,5). Низкомолекулярные декстрины обнаруживали, опрыскивая пластинки трифенилтетразолийхлоридом, анилинфосфатом или *m*-фенилендиамингидрохлоридом. Декстрины средней молекулярной массы можно обнаружить реактивом, представляющим собой смесь анилин—дифениламин—фосфорная кислота; высокомолекулярные декстрины обнаруживают, опрыскивая пластинки раствором иода. Вейл и Ханке [117] разделяли мальтодекстрины, содержавшие до 10 ед. глюкозы, на слоях кизельгура G, элюируя пробы смесью бутанол—пиридин—вода. Другой перспективный растворитель — это смесь бутанол—этанол—вода (5:3:2). Шеннон и Крич [118] исследовали, варьируя в широком диапазоне концентраций, пригодность смесей *n*-бутанол—пиридин—вода для разделения на кизельгуре G. Если предполагается, что анализ будет проводиться на одной пластинке, то лучшие результаты дает разделение на большой (20×45 см) пластинке методом ступенчатого элюирования смесью *n*-бутанол—пиридин—вода различной концентрации: 18 см смесью

39:39:22; 25 см такой же смесью; 30 см смесью 25:14:11 и, наконец, 40 см смесью 7:2:1. Перед каждым разделением пластинку сушат. Таким способом были разделены декстрины со степенью полимеризации (СП) до 27. Чтобы разделить мальтодекстрины с СП до 35, Хубер и др. [54] и Ковацевич и Ричард [54a] проводили непрерывное элюирование смесями *n*-пропанол—этанол—вода или *n*-пропанол—нитрометан—вода (5:2:3). Браун и Андерсон [119] разделили ксило- и целлодекстрины на кизельгуре G, элюируя пробу смесью 65 %-ный изопропанол—этилацетат (1:1), и на кизельгуре F, элюируя смесью изопропанол—этилацетат—вода (42:35:23) [129]. В последнем случае в группу анализируемых соединений были включены также маннодекстрины. Для обнаружения можно пользоваться реактивом Т-26.

Аспиналл и Миллер [121] анализировали декстрины методом гель-фильтрации на тонких слоях сефадекса G-200. Перед нанесением пробы ее, согласно методу Дадмана и Бишопа [122], окрашивали красителем бриллиантовый оранжевый (Procion Brilliant Orange 2RS, Dylon). При определении молекулярной массы в качестве внутреннего стандарта использовали декстран 2000.

4. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Колориметрические и спектрофотометрические методы

Бенчер и др. [123] определяли сахара, разделенные методом ТСХ, используя усовершенствованный бензидиновый метод Джонса и Придхэма [124]. С этой целью с пластинки соскребали отдельные пятна в кювету, смешивали с 0,2 мл 60 %-ного этанола, добавляли 2 мл 0,2 %-ного раствора бензидина в уксусной кислоте и нагревали смесь на кипящей водяной бане. Длительность нагревания каждого из видов сахаров была различной. Пентозы нагревали 15 мин, гексозы 30 мин, а дисахариды 60 мин. (При определении дисахаридов хроматограммы сначала, до соскребания пятен, опрыскивают концентрированной соляной кислотой.) После нагревания смесей в течение заданного времени их охлаждают и разбавляют до 2,5 мл бензидиновым реактивом. Анализ завершают центрифугированием и измерением поглощения при 350 нм. Параллельно проводят контрольный опыт с холостым экстрактом силикагеля и, анализируя растворы известных сахаров, строят стандартные кривые.

Хей и др. [24] применяли фенол-сернокислотный метод [125] и измеряли коэффициент поглощения раствора при 485 нм. Киношита и Ойяма [84] определяли концентрацию эфиров жирных кислот и сахарозы после разделения на тонких слоях антроном или железогидроксамовой кислотой. Ги [85]

для количественного определения эфиров жирных кислот и сахарозы, а также для свободных сахаров использовал реактивы Рое [126] на основе резорцина и соляной кислоты. Чтобы избежать помех, связанных с применением тонких слоев силикагеля с крахмалом в качестве связующего, Ги элюировал пятна диметилформамидом, который не извлекает мешающих примесей из крахмала и способствует лучшему элюированию сахаров с тонких слоев. Проводить разделение на слоях силикагеля G нецелесообразно, поскольку степень извлечения сахарозы невелика. Скотт [127] обнаружил, что степень извлечения кислоты зависит от сорта силикагеля: для силикагеля H степень извлечения составляет 93,1 %, для силикагеля GF 94,6 %, для силикагеля AR-7 96 % и для кизельгура 97,7 %.

Вольфром и др. [128] пользовались в качестве адсорбента восстановленной боргидридом микрокристаллической целлюлозой (см. гл. III, разд. 2), чтобы устранить влияние волокон целлюлозы при восстановлении сахаров анилингидрофталамом.

Гвин [129] проводил количественное определение восстановленных сахаров модифицированной Парком и Джонсоном [130] феррицианидной пробой. Эта проба чувствительна и позволяет определить до 0,01 мкг сахаров с самой большой степенью восстановления. Волокна целлюлозы определению не мешают.

Восстановленные сахара можно элюировать со слоев и обрабатывать тетразолиновым синим (Т-255). Поглощение формазанов измеряют при 615 нм [130а].

Эссер [131] разработал количественный метод определения аминсахаров. Обработанное нингидрином пятно соскабливают в раствор ацетата кадмия в метаноле и измеряют поглощение комплекса при 494 нм.

Определение in situ

Осуществить количественное определение сахаров методом прямой денситометрии можно только после того, как на тонких слоях будут получены видимые зоны сахаров. С этой целью применяют самые различные методы. В частности, пластинки можно опрыскивать свежеприготовленной смесью 1 г анилина, 1 г дифениламина, 10 мл фосфорной кислоты и 100 мл этанола. После сушки на воздухе пластинки нагревают при 110°C около 60 мин и охлаждают 20 мин перед сканированием в денситометре [53, 132].

Хроматограммы на слоях силикагеля опрыскивали смесью равных объемов 2,5 %-ного водного раствора щавелевой кислоты и 1,86 %-ного раствора анилина в ацетоне. После сушки пластинки сканировали денситометром [133] или промеряли методом отражательной денситометрии [134]. Конечно, этот

метод вполне пригоден только для восстановленных сахаров, однако его использовали и для проб гидролизатов. Пятна альдоз опрыскивают [135] смесью 1,5 г виннокаменной кислоты, 0,93 мл анилина и 100 мл бутанола, насыщенного водой; это лучший реактив при денситометрическом определении.

Бухаров и Карнеева [136] исследовали ряд реактивов, предназначенных для обнаружения пятен углеводов перед денситометрическим определением. Как оказалось, и восстановленные сахара, и дезоксисахара, и альдопентозы лучше всего обнаруживать следующим способом. Пластинки опрыскивают 1 %-ным раствором иодата калия, нагревают 15—20 мин при 100—120°C и опрыскивают смесью 0,1 н. раствора нитрата серебра в метаноле, гидроксида аммония и 2 н. раствора гидроксида натрия (1:1:2), после чего нагревают ИК-лампой и измеряют отраженный свет, используя фильтр (540 нм).

Один из методов обнаружения различных типов соединений — обугливание зон. Пруден и др. [137] опрыскивали слой силикагеля, содержащие сахара, раствором 1 г сульфата церия в 100 мл 10 %-ной серной кислоты. Чтобы обуглить сахара, пластинки затем нагревали 15 мин при 110°C. Как и в ТСХ вообще, при обнаружении сахаров очень важно, чтобы опрыскивание реактивом было равномерным. Лерфельд и Гудвин [138] исследовали четыре реактива для обугливания и пришли к выводу, что наиболее устойчивые результаты дает обработка сульфурилхлоридом. Согласно рекомендуемой этими авторами методике [139], пластинки выдерживают 15 мин в парах сульфурилхлорида и еще 15 мин в парах воды. Обугливание осуществляют, нагревая пластинки 30 мин при 150°C.

Губитц и др. [140] разработали флуоресцентно-денситометрический метод анализа сахарных кислот в фармацевтических препаратах. После завершения разделения хроматограмму погружают в смесь 25 мл 2 %-ного раствора тетраацетата свинца в ледяной уксусной кислоте (масса/объем) и 25 мл 1 %-ного раствора 2,7-дихлорфлуоресцеина в абсолютном этаноле (масса/объем), разбавленном до 1 л сухим бензолом. Пластинки выдерживают в темноте 30 мин и затем 30 мин сушат при 50°C в вакуумном сушильном шкафу. Флуоресценцию измеряют при 530 нм. Другой пример прямого флуоресцентного определения сахаров приведен в гл. XI, разд. 2.

Различные методы

Пастушка [3] разработал объемный метод определения сахаров, описанный в гл. XI, разд. 1.

При определении содержания рафинозы в черной патоке [142] и маннита в сорбите [142] пятна исследуемых соединений

сравниваются с пятнами стандартов. Лато и др. [143] использовали этот метод для определения сахаров в моче.

Найбом [144] обнаружил линейную зависимость между площадями пятен сахаров и десятичным логарифмом массы тонкого (0,2—0,35 мм) слоя; для толстых слоев найдена линейная зависимость между массой и корнем квадратным из площади пятна.

Количественное определение сахаров можно также проводить методом меченых атомов. Так, Шеннон и Крич [118] и Гал [145] применяли сцинтилляционные методы для определения мальтосахаридов [118] и моносахаридов [145].

5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ УГЛЕВОДОВ

Аркел и др. [146] анализировали мукополисахариды микроэлектрофоретическим методом Виеме [147, 148]. Поскольку поступающий в продажу агар загрязнен красителями, по модифицированной [149] методике Араки [150] получают агар, не содержащий сульфата (агарозу). Электрофорез проводят в 0,9 %-ной агарозе с использованием барбитуратного буферного раствора с рН 8,6 при напряженности 20 В/см. Электрофоретическое разделение завершается примерно через 7 мин. После этого тонкослойные пластинки погружают на час в 0,1 %-ный раствор цетавлона, чтобы осадить мукополисахариды. Чтобы условия осаждения были оптимальными, Аркел и сотрудники рекомендуют использовать цетавлон в физиологических солевых растворах. Зоны разделенных соединений обнаруживают, окрашивая пластинки толуидиновым синим. С этой целью 40 мг красителя растворяют в смеси 20 мл дистиллированной воды и 80 мл сухого ацетона. Пластинки выдерживают в этой смеси 15 мин, после чего ополаскивают 1 %-ным раствором уксусной кислоты до обесцвечивания фона. Эти же авторы описали другой метод окрашивания, а также метод окрашивания белков и мукополисахаридов.

Стефанович [151] изучал электрофорез группы углеводов (моно-, ди-, три- и полисахаридов) на силикагеле G, забуференном при рН 10,2, смесью на основе борной кислоты и карбоната натрия. Электрофорез проводили при 400 В и 80 мА обычно в течение 60 мин. Все углеводы движутся в сторону катода; это и другие обстоятельства приводят к заключению, что движение обусловлено электроосмосом. Однако результаты испытания метода показали, что он пригоден только для анализа углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kowalewski Z., Schindler O., Jaeger H., Reichstein R., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1280 (1960).
2. Wyss-Huber M., Jaeger H., Weiss E., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1010 (1960).
- 2a. Mansfield C. T., "Use of Thin-Layer Chromatography in Determination of Carbohydrates", in *Quantitative Thin-Layer Chromatography*, J. C. Tothstone Ed., Wiley, New York, 1973, p. 79.
- 2b. Scherz H., Stehlik G., Bancher E., Kaindl K., *Chromatogr., Rev.*, **10**, 1 (1968).
- 2в. Ghebregabher M., Rufini S., Monaldi B., Lato M., *J. Chromatogr.*, **127**, 133 (1976).
- 2г. Moczar E., Moczar M., "Thin-Layer Chromatography in Studies of Carbohydrate Side Chains of Glycoproteins", in *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*, Vol. I, A. Niederwieser and G. Pataki, Eds., Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Arbor, Mich., 1970, p. 168.
3. Pastuska G., *Z. Anal. Chem.*, **179**, 427 (1961).
4. Porges E., Porgesová L., L., *Bratislav. Lekarske Listy*, **43-1**, 513 (1963).
5. Nakai T., Demura H., Koyama M., *J. Chromatogr.*, **66**, 87 (1972).
6. Pifferi P. G., *Anal. Chem.*, **37**, 925 (1965).
7. Howard C. B., Kelleher P. C., *Clin. Chim. Acta*, **31**, 75 (1971).
8. Hettinga D. H., Miah A. H., Hammond E. G., Reinbold G. W., *J. Dairy Sci.*, **53**, 1377 (1970).
9. Lato M., Brunelli B., Ciuffini G., Mezzetti T., *J. Chromatogr.*, **34**, 26 (1968).
10. Jacin H., Mishkin A. R., *J. Chromatogr.*, **18**, 170 (1965).
11. Franken-Luykx J. M. M., Klopffer W. J., *Brauwissenschaft*, **20**, 173 (1967).
12. Capek K., Tikal I., Jarý J., Masojdkova M., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **36**, 1973 (1971).
13. Ragazzi E., Veronese G., *Farm. Pavia Ed. Prat.*, **18**, 152 (1963).
14. Lombard A., *J. Chromatogr.*, **26**, 283 (1967).
15. Ovodov Y. S., Evtushenko E. V., Vaskovsky V. E., Ovodova R. G., Solov'eva T. F., *J. Chromatogr.*, **26**, 111 (1967).
16. Lato M., Brunelli B., Ciuffini G., Mezzetti T., *J. Chromatogr.*, **39**, 407 (1969).
17. Weidemann G., Fischer W., *Z. Physiol. Chem.*, **336**, 189 (1964).
18. Washuettl J., *Mikrochim. Acta*, **1969**, 1003.
19. Pifferi P. G., *J. Chromatogr.*, **43**, 530 (1969).
20. Coite J., Mathieu M., Collombel C., *Pathol. Biol. Sem. Hop.*, **12**, 747 (1964).
21. Masera G., Kaeser H., *Minerva Pediatr.*, **16**, 14 (1964).
22. Waldi D., *J. Chromatogr.*, **18**, 417 (1965).
23. Talukder M. Q.-K., *J. Chromatogr.*, **57**, 391 (1971).
24. Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., *J. Chromatogr.*, **11**, 479 (1963).
25. Бергельсон Л. Д., Дьятловитская Е. В., Воронкова В. В., ДАН СССР, хим. секция, **141**, 1076 (1961).
26. Garbutt J. L., *J. Chromatogr.*, **15**, 90 (1964).
27. Stahl E., Kaltenbach U., *J. Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
28. Wassermann L., Hanus H., *Naturwissenschaften*, **50**, 351 (1963).
29. Prey V., Beralk H., Kausz M., *Mikrochim. Acta*, **1961**, 968.
30. Prey V., Scherz H., Bancher E., *Mikrochim. Acta*, **1963**, 567.
31. Grundschober F., Prey V., *Monatsch. Chem.*, **92**, 1290 (1961).
32. Prey V., Grundschober F., *Chem. Ber.*, **95**, 1845 (1962).
33. Bancher E., Scherz H., Prey V., *Mikrochim. Acta*, **1963**, 712.
34. Weicker H., Brossmer R., *Klin. Wochenschr.*, **39**, 1265 (1961).
35. Бергельсон Л. Д., Дьятловитская Е. В., Воронкова В. В., ДАН СССР, **149**, 1319 (1963).

36. Schweiger A., J. Chromatogr., 9, 374 (1962).
37. Metche M., Haluk J.-P., Nguyen Q.-H., Urton E., Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, 1080.
38. Grau R., Schweiger A., Z. Lebensm.-Unter.-Forsch., 119, 210 (1963).
39. Vomhof D. W., Tucker T. C., J. Chromatogr., 17, 300 (1965).
40. Damonte A., Lombard A., Tourn M. L., Cassone M. C., J. Chromatogr., 60, 203 (1971).
41. Wolfrom M. L., Patin D. L., de Lederkremer R. M., J. Chromatogr., 17, 488 (1965).
42. Linek K., Kuniak L., Alince B., Chem. Zvesti, 21, 99 (1967).
43. Ersser R. S., Andrew B. C., Med. Lab. Technol., 28, 355 (1971).
44. Drews G., Z. Naturforsch., 23b, 671 (1968).
45. Kamp W., Van Oort A., Pharm. Weekbl., 102, 1295 (1967).
46. Petre R., Dennis R., Jackson B. P., Jethwa K. R., Planta Med., 21, 81 (1972).
47. Petrović S. M., Canic V. D., Mikrochim. Acta, 1969, 599.
48. Berger P. D., Agate A. S., J. Chromatogr., 39, 232 (1969).
49. Жданов Я. А., Дорофеев Г. Н., Зеленская С. В., ДАН СССР, 149, 1332 (1963).
50. Afjonso A., J. Chromatogr., 27, 324 (1967).
51. Hesse G., Alexander M., Jour. Int. Etude Methodes Sep. Immed. Chromatogr., Paris, 1961, (pub. 1962), p. 229.
52. Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H. A., Suppan F., Z. Naturforsch., 17B, 352 (1962).
53. Mansfield C. T., McElroy H. G., Jr., Anal. Chem., 43, 586 (1971).
54. Huber C. N., Scobell H. D., Tai H., Fischer E. E., Anal. Chem., 40, 207 (1968).
- 54a. Covacevich M. T., Richards G. N., J. Chromatogr., 129, 420 (1976).
55. Marais J. P., J. Chromatogr., 27, 321 (1967).
56. Grafe I., Engelhardt H., Chromatographia, 5, 307 (1972).
57. Stroh H. H., Schueler W., Z. Chem., 4, 188 (1964).
58. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Усов А. И., ДАН СССР, 143, 863 (1962).
59. Grasshof H., J. Chromatogr., 14, 513 (1964).
60. Grasshof H., Deut. Apoth.-Ztg., 103, 1396 (1963).
61. Tore J. P., J. Chromatogr., 12, 413 (1963).
62. de Souza N. O., Panek A., J. Chromatogr., 15, 103 (1964).
63. Kartnig T., Wegschaidler O., J. Chromatogr., 61, 375 (1971).
64. Pastuszyn A., Michl H., Mitt. Versuchsstn. Gaerungsgewerbe Inst. Angew. Mikrobiol., 20, 1 (1966); through Chem. Abstr., 66, 65779t (1967).
65. Frigge K., Experientia, 22, 767 (1966).
66. Mezzetti T., Ghebreghiabhier M., Rufini S., Ciuffini G., Lato M., J. Chromatogr., 74, 273 (1972).
67. Spitschan R., J. Chromatogr., 61, 169 (1971).
68. Powning R. F., Irzykiewicz H., J. Chromatogr., 29, 115 (1967).
69. Saif-ur-Rahman S., Krishnamurti C. R., Kitts W. D., J. Chromatogr., 38, 400 (1968).
70. Hansen S. A., J. Chromatogr., 105, 388 (1975).
71. Mezzetti T., Rufini S., Ciuffini G., Minerva Pediatr., 23, 1509 (1971); through Anal. Abstr., 23, 1898 (1972).
72. Mezzetti T., Lato M., Rufini S., Ciuffini G., J. Chromatogr., 63, 329 (1971).
73. Collins F. W., Chandorkar K. R., J. Chromatogr., 56, 163 (1971).
- 73a. Shellard E. J., Jolliffe G. H., J. Chromatogr., 24, 76 (1966).
74. Rink M., Herrmann S., J. Chromatogr., 12, 415 (1963).
75. Tore J. P., Anal. Biochem., 7, 123 (1964).
76. Haas H. J., Seeliger A., J. Chromatogr., 13, 573 (1964).
77. Applegarth D. A., Dutton G. G. S., Tanaka Y., Can. J. Chem., 40, 2177 (1962).
78. Bowker D. M., Turvey J. R., J. Chromatogr., 22, 486 (1966).
79. Linow F., Ruttloff H., Tæufel K., Naturwissenschaften, 21, 689 (1963).
80. Ranny M., Veda Vyzk. Prum. Potravin., 18, 191 (1968); through Chem. Abstr., 72, 62550z (1970).
81. Weiss T. J., Brown M., Zeringue H. J., Jr., Feuge R. O., J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 145 (1971).
82. Sahasrabudhe M. R., Chadha R. K., J. Am. Oil Chem. Soc., 46, 8 (1969).
83. Kinoshita S., Kogyo Kagaku Zasshi, 66, 450 (1963); Chem. Abstr., 60, 3207 (1964).
84. Kinoshita S., Oyama M., Kogyo Kagaku Zasshi, 66, 455 (1963); Chem. Abstr., 60, 3208 (1964).
85. Gee M., J. Chromatogr., 9, 278 (1962).
86. Kirchner J. G., Miller J. M., Keller G. J., Anal. Chem., 23, 420 (1951).
87. Dumazert C., Ghiglione C., Pugnet T., Bull. Soc. Chim. Fr., 1963, 475.
88. Deferrari J. O., de Lederkremer R. M., Matsuhira B., Sproviero J. F., J. Chromatogr., 9, 283 (1962).
89. Dumazert C., Ghiglione C., Pugnet T., Bull. Soc. Pharm. Mars., 12, 337 (1963).
90. Micheel F., Berendes O., Mikrochim. Acta, 1963, 519.
91. Tate M. E., Bishop C. T., Can. J. Chem., 40, 1043 (1962).
92. Cadenas R., Deferrari J. O., Analyst (London), 86, 132 (1961).
93. Wolfrom M. L., de Lederkremer R. M., Anderson L. E., Anal. Chem., 35, 1357 (1963).
94. Waring P. P., Ziporin Z. Z., J. Chromatogr., 15, 168 (1964).
95. Grasseiti D. R., Murray J. F., Jr., Wellings J. L., J. Chromatogr., 18, 612 (1965).
96. Dietrich C. P., Dietrich S. M. C., Pontis H. G., J. Chromatogr., 15, 277 (1964).
97. Prey V., Berbalk H., Kausz M., Mikrochim. Acta, 1962, 449.
98. Tschesche R., Wulff G., Tetrahedron, 19, 621 (1963).
99. Gee M., Anal. Chem., 35, 350 (1963).
100. Stoffyn A., Stoffyn P., Martensson E., Biochim. Biophys. Acta, 152, 353 (1968).
101. Mield P. A., Lee Y. C., Anal. Biochem., 49, 534 (1972).
102. Modi B. D., Patil J. R., Bose J. L., Indian J. Chem., 2, 32 (1964).
103. Tate M. E., Bishop C. T., Can. J. Chem., 41, 1801 (1963).
104. Lehrfeld J., J. Chromatogr., 32, 685 (1968).
105. Kaerkkainen J. E., Hahti E. O., Lehtonen A. A., Anal. Chem., 38, 1316 (1966).
106. Guenther H., Schweiger A., J. Chromatogr., 17, 602 (1965).
107. Martz M. D., Krivis A. F., Anal. Chem., 43, 790 (1971).
108. Суздалева Н. И., Степаненко Б. Н., Зеленкова В. В., Прикладная биохимия и микробиология, 4, 320 (1968).
109. Haas H. J., Weigerding A., Carbohydrate Res., 12, 211 (1970).
110. Vladovska-Yukhnovska Y., Ivanov C. P., Malgrand M., J. Chromatogr., 90, 181 (1974).
111. Haas H. J., Schwiensch G., J. Chromatogr., 42, 124 (1969).
112. Ernst W., Anal. Chim. Acta, 40, 161 (1968).
113. Guenther H., Schweiger A., J. Chromatogr., 34, 498 (1968).
114. Wiedenhof N., J. Chromatogr., 15, 100 (1964).
115. Takeo K., Kondo Y., Kuge T., Agric. Biol. Chem., 34, 954 (1970).
116. Diemair W., Koebel R., Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 124, 157 (1964).
117. Weill C. E., Hanke P., Anal. Chem., 34, 1736 (1962).
118. Shannon J. C., Greech R. G., J. Chromatogr., 44, 307 (1969).
119. Brown W., Andreson O., J. Chromatogr., 57, 255 (1971).
120. Brown W., Chitumbo K., J. Chromatogr., 66, 370 (1972).
121. Aspinall P. T., Miller J. N., Anal. Biochem., 53, 509 (1973).

122. *Dudman W. F., Bishop C. T.*, Can. J. Chem., **46**, 3079 (1968).
123. *Bancher E., Scherz H., Kaindl K.*, Mikrochim. Acta, **1964**, 652.
124. *Jones J. K. N., Pridham J. B.*, Biochem. J., **58**, 288 (1954).
125. *Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.*, Anal. Chem., **28**, 350 (1956).
126. *Roe J. H.*, J. Biol. Chem., **107**, 15 (1934).
127. *Scott R. W.*, J. Chromatogr., **49**, 473 (1970).
128. *Wolfrom M. L., de Lederkremer R. M., Schwab G.*, J. Chromatogr., **22**, 474 (1966).
129. *Guinn G.*, J. Chromatogr., **30**, 178 (1967).
130. *Park J. T., Johnson M. J.*, J. Biol. Chem., **181**, 149 (1949).
- 130a. *Raadsveld C. W., Klomp H.*, J. Chromatogr., **57**, 99 (1971).
131. *Esser K.*, J. Chromatogr., **18**, 414 (1965).
132. *Welch B. L., Martin N. E.*, J. Chromatogr., **72**, 359 (1972).
133. *Mizelle J. W., Dunlap W. J., Simon H. Wender*, J. Chromatogr., **28**, 427 (1967).
134. *Kringstad K.*, Norsk Skogind., **21**, 210 (1967); through Anal. Abstr., **15**, 4826 (1968).
135. *Champagnol F., Bourzeix M.*, J. Chromatogr., **59**, 472 (1971).
136. *Бухаров В. Г., Карнеева Л. Н.*, Изв. АН СССР, сер. хим., **1970**, 1473.
137. *Pruden B. B., Pineault G., Loufi H.*, J. Chromatogr., **115**, 477 (1975).
138. *Lehrfeld J., Goodwin J. C.*, J. Chromatogr., **45**, 150 (1969).
139. *Jones D., Bowyer D. E., Gresham G. A., Howard A. N.*, J. Chromatogr., **24**, 226 (1966).
140. *Guebitz G., Frei R. W., Bethke H.*, J. Chromatogr., **117**, 337 (1976).
141. *Prey V., Braunsteiner W., Goller R., Stressler-Buchwein F.*, Z. Zuckerind. **14**, 135 (1964).
142. *Castagnola V.*, Boll. Chim. Farm., **102**, 784 (1963).
143. *Lato M., Brunelli B., Ciuffini G.*, J. Chromatogr., **36**, 191 (1968).
144. *Nybom N.*, J. Chromatogr., **28**, 447 (1967).
145. *Gal A. E.*, J. Chromatogr., **34**, 266 (1968).
146. *van Arkel C., Ballieux R. E., Jordan F. L. J.*, J. Chromatogr., **11**, 421 (1963).
147. *Wieme R. J.*, Clin. Chim. Acta, **4**, 317 (1959).
148. *Wieme R. J., Rabaey M.*, Naturwissenschaften, **44**, 112 (1957).
149. *Hjerten S.*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 514 (1961).
150. *Araki C.*, Int. Congr. Biochem., 4th Vienna, 1958, **1**, 15 (1959).
151. *Stefanovich V.*, J. Chromatogr., **31**, 466 (1967).

Глава XX

КАРБОНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

1. НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Маркузе и сотр. [1, 2] провели обширное исследование разделения алкилальдегидов и кетонов на силикагеле G, активированном 30 мин при 120°C. В табл. 20.1 приведены величины R_f ряда этих соединений. Для альдегидов с использованием бензола в качестве элюента получены следующие

Таблица 20.1

Величины $R_f \times 100$ некоторых алифатических кетонов, полученные на силикагеле G [2]^a

Кетон	Петролейный эфир—диэтиловый эфир (98 : 2) ^б	Бензол ^в
Тридеканаль	32	65
Пентадеканон-2	21	37
Тридеканон-3	32	56
Тридеканон-4	35	61
Додеканон-5	38	64
Тридеканон-6	42	67
Тридеканон-7	45	68
Пентадеканон-8	47	73
Гептадеканон-9	50	77
Генэйкозанон-10		80 ^в
Генэйкозанон-11	57	84
Трикозанон-12	60	87
Гептакозанон-13		81 ^в
Гептакозанон-14	64	87

^a С разрешения авторов и Industrieverlag von Bernhausen K. G.

^б Длина пути разделения 10 см.

^в Данные работы [1].

величины R_f : пентаналь 0,53; гептаналь 0,55; октаналь 0,56; нонаналь 0,59, деканаль 0,62; ундеканаль 0,63; додеканаль 0,64; тридеканаль 0,65; тетрадеканаль 0,66. С тем же растворителем получены R_f ряда алканон-3-ов: нонанон 0,47; деканон 0,50; ундеканон 0,52; додеканон 0,54; тридеканон 0,56; гексадеканон 0,62; октадеканон 0,66; эйкозанон 0,68. На слоях, пропитанных ундеканом, можно достичь лучшего разделения. Результаты испытания ряда смесей растворителей показали, что лучшее разделение альдегидов от C_{10} до C_{14} достигается со смесью метанол—вода (7:3). При разделении более высокомолекулярных альдегидов содержание воды уменьшают. При разделении кетонов на пропитанных слоях лучшим растворителем оказалась смесь метанол—вода (9:1). Разделение можно также проводить со смесью ацетонитрил—вода или уксусная кислота. Альдегиды отделяют от кетонов, а также выявляют гомологи в смесях обеих групп соединений методом двумерного элюирования. Сначала проводят разделение на непропитанных слоях силикагеля; после удаления растворителя с пластинки неиспользованную ее часть (выше линии старта) пропитывают ундеканом и повторяют разделение, но уже с другим растворителем и в перпендикулярном первому разделению направлении. Для двумерного хроматографирования альдегидов C_{10} — C_{14} используют смеси петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (97:2:1) и метанол—вода—уксусная кислота (7:3:2). Кетоны с кетогруппой в положении 3 с таким же, как и у альдегидов, числом атомов углерода C_{10} — C_{20} хроматографируют бензолом в одном направлении и метанолом — в другом. При двумерном хроматографировании альдегидов и кетонов с одновременным разделением индивидуальных гомологов применяют ряд комбинаций растворителей, например смесь бензол—уксусная кислота (99:1) или петролейный эфир—диэтиловый эфир (98:2) в одном направлении и смеси ацетонитрил—уксусная кислота (3:1) или метанол—вода (9:1) — в другом. Авторы рассмотрели возможность применения многих реактивов для обнаружения карбонильных групп и выбрали 10 %-ный раствор фосфомолибденовой кислоты в этаноле. После опрыскивания этим реактивом пластинки нагревают при 120°C.

Махадеван и др. [3] отделяли диметилацетали альдегидов от метиловых эфиров и высших жирных альдегидов методом ТСХ на силикагеле G. Чтобы разделить метиловые эфиры и альдегиды, проводили второе элюирование смесью петролейный эфир (30—60°C)—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90:10:1) в другом направлении. Насыщенные альдегиды отделяли от ненасыщенных на силикагеле, пропитанном нитратом серебра, с помощью смеси петролейный эфир—диэтиловый

эфир (19:6); при этом насыщенные альдегиды движутся вместе с фронтом растворителя. Ненасыщенные альдегиды разделялись в соответствии со степенью их ненасыщенности. Менее ненасыщенные соединения характеризуются более высокими величинами R_f . Насыщенные альдегиды удаляют эфиром и разделяют на пропитанном силиконом силикагеле методом распределительной хроматографии с обращенной фазой.

Элюирование проводят трижды, все 3 раза 85 %-ным водным ацетоном, насыщенным до 90 % силиконом.

Для разделения группы β -дикарбонильных соединений Борднер и др. [4] использовали слой силикагеля, замешанный на крахмале, и элюирующую смесь бензол—этилацетат. Для разделения алифатических компонентов приемлемо смесь бензол—этилацетат (7:3), а при разделении ароматических соединений хорошие результаты получены с теми же растворителями при соотношении 1:1. Кучера [5], применяя незакрепленные слои оксида алюминия и смесь гексан—ацетон (4:1), определил величины R_f ряда diketонов: диацетил 0,76; ацетилацетон 0,03; ацетонилацетон 0,40 и форон 0,86. Саито и Сузуки [6] провели хроматографический анализ десяти β -дикетонов в четыреххлористом углероде, толуоле, бензоле, дихлорметане и диэтиловом эфире.

Дар и Мизра [7] исследовали группу из 93 α , β -ненасыщенных карбонильных соединений на силикагеле G со смесью петролейный эфир (40—60°C)—этилацетат (5:1). Хроматографическое разделение проводили в камере с насыщенной атмосферой. Другую группу из 20 соединений разделяли, используя смесь бензол—петролейный эфир (40—60°C) (2:3) [8].

Петрович [9] хроматографировал группу оксиальдегидов на пластинках с силикагелем, элюентом служила смесь бензол—метанол (95:5), длина пути разделения составляла 12 см. Полученные величины R_f приведены в табл. 20.2. Германек и др. [10] разделяли оксиальдегиды на незакрепленных слоях оксида алюминия (табл. 20. 2). Преи и др. [11] анализировали оксиальдегиды на слоях силикагеля, забуференных 0,1 н. раствором борной кислоты. Растворителями для забуференных слоев служили смеси бутанол—вода (9:1) и бутанол—ацетон—вода (4:5:1). Для обнаружения этих соединений использовали аммиачный раствор нитрата серебра.

Хавла и др. [12] разделили группу из 6 оксиксантонов на силикагеле G, пропитанном 2 %-ным нитробензолом. Разделение проводили в камере с насыщенной атмосферой смесью бензол—ксилол—этилформиат—муравьиная кислота (3:7:8:2). По окончании разделения соединения обнаруживали иодом, спиртовым раствором хлорида железа (III) или 15 %-ной серной кислотой. Салех [13] разделил методом ТСХ на

Бензальдегид	Силикагель G [22] ^a			Силикагель С [9], длина пути разделения 12 см	Незакрытые слои оксида алюминия (активность по Брокману III) [10]			
	бензол—этил—ацетат—уксусная кислота (30 : 5 : 5)		хлороформ		бензол—пирдин (9 : 1)	бензол—этанол		
	бензол—этил—ацетат—уксусная кислота (30 : 5 : 5)	хлороформ				(98 : 2)	(95 : 5)	(90 : 10)
Бензальдегид	1,50	1,52	1,42	0,19	0,80	0,84	0,26	
o-Оксибензальдегид	0,66	0,24	0,90	0,17	0,32	0,44	0,11	
m-Оксибензальдегид	0,51	0,16	0,78		0,03	0,30	0,05	
p-Оксибензальдегид	0,66	0,20	0,79		0,02	0,15		
2,4-Диоксибензальдегид	0,59	0,20	0,76					
2,5-Диоксибензальдегид	0,17	0,02	0,32	0,06	0,03	0,04	0,06	
3,4-Диоксибензальдегид	1,33	1,25	0,87	0,53				
2-Окси-3-метоксибензальдегид	1,54	1,48	1,19		0,03			
2-Окси-3-этоксибензальдегид	0,62	0,55	0,71		0,04	0,21	0,26	
3-Окси-4-метоксибензальдегид	0,80	0,77	0,89		0,04	0,13		
3-Окси-4-этоксибензальдегид	0,81	0,71	0,80	0,27	0,04		0,13	
4-Окси-3-метоксибензальдегид	1,00	1,00	1,00	0,14				
4-Окси-3-этоксибензальдегид	0,56	0,50	0,43		0,19	0,39		
3,4-Диокси-5-метоксибензальдегид	0,21	0,10	0,18					
o-Метоксибензальдегид	1,58	1,49	1,38	0,65				
m-Метоксибензальдегид	1,72	1,58	1,52					
p-Метоксибензальдегид	1,47	1,47	1,41					
2,3-Диметоксибензальдегид	1,42	1,55	1,36					
2,4-Диметоксибензальдегид	1,16	1,30	1,09					
2,5-Диметоксибензальдегид	1,60	1,54	1,42	0,45				
3,4-Диметоксибензальдегид	0,98	1,43	1,13					
3,4-Метилendioксибензальдегид	1,51	1,56	1,40					
3,5-Диметоксибензальдегид	1,73	1,68	1,53					
3,4,5-Триметоксибензальдегид	1,10	1,36	1,23					

^a Величины R_f , отнесенные к 4-окси-3-этоксибензальдегиду.

силикагеле DS-5 (фирма SAMAG) 25 природных оксиксантонов, используя 35 смесей растворителей. Полученные им величины R_f приведены в указанной статье. Арендс [14] предпочитал для ксантонов применять особо чистый силикагель с добавкой 2% двуназиевой соли ЭДТА, поскольку это позволяет предотвратить размытие задней границы пятна. Связующим служила смесь кукурузного крахмала и тапиоки, элюентом — смесь метилхлорид—этилацетат (19:1).

Кнаппе и др. [15] анализировали смесь замещенных 2-оксибензофенонов на слоях кизельгура, оксида алюминия, порошке целлюлозы или силикагеле, пропитанных полиэфиром триэтиленгликоля и адипиновой кислоты. Пропитывающие реагенты прибавляли к суспензии адсорбента и тщательно перемешивали. Если адсорбент — неорганическое соединение, то 30 г такого адсорбента смешивали с 12 г раствора полиэфира (от 80 до 82% полиэфира триэтиленгликоля и адипиновой кислоты в метилгликоле), 25 мл воды, 25 мл этанола и 0,05 г диэтилдитиокарбамата натрия. После нанесения слоев пластинки сушили 30 мин при 105°C. Если носитель — целлюлоза, то 15 г порошка целлюлозы MN 300 смешивали с 6,2 г раствора полиэфира, 0,05 г диэтилдитиокарбамата натрия, 35 мл воды и 35 мл спирта. Слои сушили при той же температуре. Разделение проводили смесью *m*-ксилола и муравьиной кислоты (98:2), насыщенной полиэфиром. Дурижинова и Белуж [16] привели величины R_f для 38 производных 2-оксибензофенона, полученные на силикагеле G со смесью четыреххлористый углерод—этанол (120:1), полиамида со смесью хлороформ—уксусная кислота (4:1), силикагеле G (пропитанном борной кислотой) со смесями гептан—этанол (3:1), четыреххлористый углерод—этанол (120:1) и хлороформ—бензол (4:1). Для обнаружения применяли диазотированную сульфаниловую кислоту. Либзвар и др. [17] использовали тонкие слои оксида алюминия для контроля за классическим синтезом хлорамфеникола. Чистоту *n*-нитрофенона проверяли по протеканию бромирования, оксиметилирования α -ацетида-*n*-нитроацетофенона, восстановлению α -ацетида- β -окси-*n*-нитроацетофенона и дихлорацетилованию *D*-трео-1-*n*-нитрофенилпропандиола-1,3.

Хейфиц и др. [18] разделили группу из 15 алкилциклогексанонов на слоях нейтрального оксида алюминия, элюируя компоненты смесью бензол—петролейный эфир (1:3). Обнаруживающим реагентом служили пары иода.

Корэ и др. [19] разделяли некоторые ацетали и соответствующие альдегиды на тонких слоях силикагеля 15%-ным раствором этилацетата в гексане. Обнаружение компонентов осуществляли, опрыскивая хроматограммы насыщенным раствором 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. соляной кислоте. Махадеван

и др. [3] анализировали диметилацетали высших жирных альдегидов на пластинках силикагеля G, пропитанного силиконом, используя 85 %-ный водный ацетон, насыщенный до 90 % силиконом. Разделение на слоях силикагеля, пропитанных нитратом серебра, со смесью петролейный эфир (30—60°C) — диэтиловый эфир (22:3) протекало в соответствии со степенью ненасыщенности. Циклические ацетали длинноцепочечных альдегидов отделяли от свободных альдегидов и примесей на силикагеле, элюируя пробу ксилолом [20]. Кулоневиц и др. [21] разделяли циклические ацетали 2-фуральдегида и сходные альдегиды на незакрепленных слоях оксида алюминия, применяя смесь ацетон—бензол (1:10). Таким способом было выделено несколько *цис—транс*-изомеров. Висванатан и др. [21a] хроматографически проанализировали диметилацетали додеканаля, гексадеканаля и *цис, цис, цис*-9,12,15-октадекатриеналя и диэтил-, дипропил-, диаллил-, дибутил-, диизобутил-, дипентил- и диизопентилацетали гексадеканаля на силикагеле G, используя толуол в качестве элюента. В результате эти авторы выявили четыре пары соединений, разделить которые можно только другими методами ТСХ. Корэ и др. [19] хроматографировали 22 ацетала и альдегида на хроматографических полосах Кирхнера [24]. Разделение проводили на силикагеле с алебастром в качестве связующего (так называемый силикагель G), применяя для элюирования 15 %-ный раствор этилацетата в гексане.

2. РАЗДЕЛЕНИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

2,4-Динитрофенилгидразоны

Оное [23] первым осуществил в 1952 г. разделение алифатических 2,4-динитрофенилгидразонов методом ТСХ. Методом хроматографических полос, предложенным Кирхнером и др. [24], Оное провел разделение ряда 2,4-динитрофенилгидразонов, включая динитрофенилгидразоны *n*-алифатических альдегидов до C₁₀. Разделение он проводил на силикагеле, пропитанном 2,5 %-ным раствором поливинилового спирта. В настоящее время для разделения этих соединений предложено много различных хроматографических систем. Лаба и Монт в 1953 г. [25] применяли слои силикагеля с бентонитом (4:1) и использовали методику ступенчатого элюирования с тремя различными смесями растворителей. Росмус и Дейл [26] описали разделение на незакрепленных слоях оксида алюминия ряда карбониллов 2,4-динитрофенилгидразонов; элюирование проводилось смесью бензол—гексан (1:1). Борде и Мишель [27] разделили смесь 0,02 мкмоль ацетона, метилэтилке-

тона и метилпропилкетона на силикагеле с 5 различными системами растворителей; Пайлер и др. [28] также применил силикагель для разделения и идентификации низкомолекулярных карбонильных производных, содержащихся в сигаретном дыме. Ринк и Герман [29] разделили 2,4-динитрофенилгидразоны ацетона и ацетоуксусной кислоты, выделенной из мочи, на ацетилованной целлюлозе со смесями метанол—вода—25 %-ный раствор гидроксида аммония (90:10:3) и *n*-пропанол—раствор карбоната аммония (2,5:1). Раствор карбоната аммония готовили, смешивая два объема 10 %-ного раствора карбоната аммония с одним объемом 5 н. раствора гидроксида аммония. Донт и др. [30] проанализировали группу 2,4-динитрофенилгидразонов девяти альдегидов, встречающихся в пищевых продуктах (табл. 20.3). Величины R_B (величины R_f , отне-

Таблица 20.3

Величины R_B^a группы 2,4-динитрофенилгидразонов девяти альдегидов, обнаруженных в пищевых продуктах (адсорбент — силикагель G) [30]^b

Альдегид	Бензол—петролейный эфир (3:1)	Бензол—этилацетат (95:5)
Ванилин	0,06	0,17
Вератровый альдегид	0,0	0,45
Этилванилин	0,0	Полосы
Салицилальдегид	0,50	0,85
Коричный альдегид	0,83	1,04
Бензальдегид	1,06	1,03
α -Ионон	1,40	1,14
β -Ионон	1,41	1,14
Анисовый альдегид	—	0,88

^a $R_B = R_f$ (соединение)/ R_f (цинковый желтый).
^b С разрешения авторов и W. Heffer and Sons.

сенные к цинковому желтому) приведены для силикагеля с двумя различными смесями растворителей, которые можно с успехом использовать и для двумерного разделения.

Мелитц и др. [31] применили группу растворителей для анализа 2,4-динитрофенилгидразонов. Результаты работы показали, что на пластинках силикагеля производные алифатиче-

ских альдегидов и кетонов до примерно C_{10} можно разделить смесью четыреххлористый углерод—гексан—этилацетат (10:2:1). Карбонильные соединения большей молекулярной массы удается разделить смесью петролейный эфир (40—60°C) — диизопропиловый эфир (22:3), а ароматические карбонильные соединения—смесью бензол—гексан (3:2). В состав природных продуктов, используемых для придания пище аромата, часто входят такие карбонильные соединения, которые не удается разделить хроматографически. Поэтому авторы работы [31] стремились найти цветные реакции, которые позволили бы идентифицировать такие соединения, как, например, капроновый альдегид, 2-гексеналь и метилпропилкетон, 2,4-динитрофенилгидразоны которых со смесью четыреххлористый углерод—гексан—этилацетат дают R_B 0,88—0,89. Однако при опрыскивании хроматограммы смесью 0,2 %-ного раствора феррицианида калия и 0,01 %-ного раствора гексагидрата хлорида железа(III) в 2 н. соляной кислоте (Т-201) эти соединения можно отличить друг от друга. Под действием указанного реактива пятно метилпропилкетона сначала становится зеленовато-синим, затем быстро синее; пятно 2-гексенала не меняет окраски, но становится более интенсивным, а пятно капронового альдегида спустя длительный промежуток времени становится оливково-зеленым, а после 15-минутной выдержки синее. Анализ данных, полученных для всей серии соединений, позволяет сделать следующие выводы [31]. «Вопервых, зоны ДНФГ-производных насыщенных кетонов окрашиваются сразу же. Во-вторых, ДНФГ-производные насыщенных альдегидов реагируют медленнее и чаще всего их зоны окрашиваются в оливково-зеленый цвет (после 15-минутной выдержки они становятся синими). В-третьих, зоны ДНФГ-производных ненасыщенных карбонильных соединений до C_{10} не окрашиваются, но их первоначальный цвет становится более интенсивным. Более высокомолекулярные соединения реагируют спустя длительное время; их зоны окрашиваются в слабо-желтый цвет». В табл. 20.4 приведены величины R_f исследованных соединений и указаны цветные реакции.

Авинен и Фаворская [32] описали микрометод получения 2,4-динитрофенилгидразонов альдегидов и кетонов с последующей их идентификацией методом ТСХ. Получают эти производные следующим образом: 13—17 мг карбонильного соединения кипятят 25—30 мин в колбе с обратным холодильником на водяной бане с 25 мл раствора предварительно очищенного 2,4-динитрофенилгидразина. Чтобы получить 50 мл раствора последнего, 100 мг гидразина и 550 мг щавелевой кислоты растворяют в метаноле. В работе [32] приведены величины R_f ряда соединений. Вильденхайн и Хенсеке [33] описали методику получе-

ния ДНФГ-производных фенольных карбонильных соединений, концентрация которых мала. Методика эта ценна тем, что авторам ее удалось подобрать такие условия [34], при которых влияние ОН-группы, затрудняющей этерификацию, не сказывается. Ронкайнен и Бруммер [35] исследовали синтез ДНФГ-производных в сильно разбавленных растворах, в первую очередь в спиртовых. бис-Гидразоны дикарбонитов можно осадить, а моногидразоны альдегидов и кетокислот выделяют адсорбцией на активном угле с последующей экстракцией в приборе Сокслета сначала метилформиатом и дихлорметаном (для извлечения производных альдегидов), а затем в атмосфере азота при пониженном давлении (17 мм рт. ст.) азеотропной смесью пиридин—вода (для извлечения производных кетокислот). На этой последней стадии производные щавелевоуксусной кислоты декарбоксилируются главным образом в гидразоны пировиноградной кислоты. Крашке и Эдвардс [36] проверяли предложенную Шварцем и др. [37] методику получения с количественным выходом ДНФГ-производных путем пропускания раствора, содержащего карбонильные соединения, через колонку, заполненную смесью динитрофенилгидразин—фосфорная кислота—целит. Авторы работы [36] подчеркивают необходимость наличия устойчивого, не содержащего примесей карбонильных соединений растворителя, поскольку некоторые образцы петролейного эфира образуют ДНФГ-производные при прохождении через колонку Шварца. Метод ТСХ, предложенный Крашке и Эдвардсом [38] (как поясняется далее в тексте), использовали для разделения «чистых» производных: предварительно их методом Сзоны [39] отделяли от непрореагировавшего реактива и примесей. Шварц и др. [40] освобождали 2,4-ДНФГ-производные от избытка реактива, пропуская через колонку, заполненную свежеработанной катионообменной смолой AG 50W-X4; в качестве элюентов эти исследователи использовали очищенный метанол и не содержащий примесей карбонильных соединений бензол. Степень извлечения контрольной пробы 2,4-ДНФГ-производного составляет 98—101 %; 1 г сухой смолы удерживает 100 мг реактива.

Шевченко и Фаворская [41] распространили метод Авинена и Фаворской [32] на разделение изомерных ДНФГ-кетонов. Хроматографирование велось на слоях оксида алюминия со смесью циклогексан—диэтиловый эфир (4:1). При этом были получены следующие величины R_f : изобутилметилкетон 0,31; диэтилкетон 0,32; метилбутилкетон 0,30; метилпропилкетон 0,27; изопропилэтилкетон 0,41; этилпропилкетон 0,39; циклопентанон 0,20; пинаколон 0,41; циклогексанон 0,24 и изопропилметилкетон 0,31. В тех случаях, когда соединения не удавалось

Величины R_B^a и цветные реакции 2,4-динитрофенилгидразонов ряда карбонильных соединений, полученные на силикагеле G [31] ^b

Карбонильное соединение	Четыреххлористый углерод-гексан-этил-ацетат (10 : 2 : 1)	Петролейный эфир (40-60°С) - диизопропиловый эфир (22 : 3)	Время, необходимое для проявления окраски ^b , с	Окраска	Замечания
Метаналь	0,40	0,23	20	Зеленая	120 с, слабо-зеленая, 180 с, синяя
Этаналь	0,46	0,26	30	"	То же
Пропаналь	0,64	0,31	30	"	"
2-Метилпропаналь	0,82	0,65	50	"	120 с зеленая, 180 с, слабо-зеленая, 230 с, синяя
Бутаналь	0,74	0,56	30	Нежно-зеленая	То же
2-Метилбутаналь	0,82	0,69	40	"	"
Пентаналь	0,81	0,68	30	"	100 с, зеленая, 180 с, синяя,
Гексаналь	0,88	0,75	45	"	120 с, зеленая, 170 с, слабо-зеленая, 230 с, синяя
Гептаналь	0,93	0,79	45	"	То же
Октаналь	0,98	0,84	45	"	"
Нонаналь	0,99	0,86	50	"	"
Деканаль	1,03	0,89	50	"	"
Додеканаль	1,07	0,91	50	"	"
Ацетон	0,61	0,25	15	Зеленовато-синяя	25 с, синяя
Метилэтилкетон	0,78	0,69	15	"	То же
Метилпропилкетон	0,89	0,81	25	"	"
Циклогексан	0,75	0,61	10	Зеленая	30 с, синяя

α -Ионон	1,11	1,23	70	Грязно-зеленая	
<i>d</i> -Карвон	1,13	1,25	10	Углубление окраски	
<i>d</i> -Карвон	1,15	1,22			
α -Ионон	1,20	1,32	45	Грязно-зеленая	
Акролеин	0,62	0,42	270	Зеленая	
Кротоновый альдегид	0,67	0,45	10	Углубление окраски	
<i>транс</i> -Гексен-2-аль	0,88	0,75	10	То же	
Гексен-2-аль	0,89	0,76	10	Углубление окраски, через 5 мин очень слабое окрашивание	
Децеп-2-аль	1,06	0,97	10	Углубление окраски	
Додецен-1-аль	1,10	1,04	300	Очень слабое зеленое окрашивание	
Цитраль	0,98 1,05	0,79 0,96	10	Углубление окраски	270 с, грязно-желто-зеленая
Фурфураль	0,43	0,21	10	Углубление окраски	120 с, серая, 240 с, синяя
Анисовый альдегид	0,50	0,21	10	То же	То же
Бензальдегид	0,76		10	"	"
Ацетофенон	0,96		10	"	"

^a $R_B = R_f$ (соединение) / R_f (масляный желтый).

^b С разрешения авторов и Alfred Neuthig Verlag.

^c Реактив для опрыскивания: 0,2 %-ный раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0,01 %-ный раствор $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в 2 н. HCl.

разделить одномерным хроматографированием, применяли двумерное разделение.

ДНФГ-производные хроматографируют также на активированном оксиде магния. Шварц и Паркс [42] использовали слои, состоявшие из 15 г сисорба 43 (активированный оксид магния, Fisher) и 6 г целита. Адсорбенты суспендировали в 45 мл 95 %-ного этанола и наносили на стеклянные пластинки, которые сушили вначале на воздухе, а затем 16—20 ч при 100°C. Применяя смесь хлороформ—гексан (17:3), можно разделить ДНФГ-производные на классы; пятна этих соединений окрашены по-разному, поэтому их легко идентифицировать. Производные метилкетона дают серые пятна, у этих соединений самые высокие R_f ; пятна производных насыщенных альдегидов окрашены в рыжевато-коричневый цвет, величины R_f несколько ниже; далее следуют 2-ненасыщенные альдегиды, они дают пятна ржаво-красного цвета и, наконец, альдегиды с двумя ненасыщенными связями (2, 4), они образуют лавандовые пятна и у них самые низкие величины R_f . Иногда наблюдается перекрывание зон, но их можно различить по окраске. Шварц и др. [43] распространили этот метод на дикарбонил-бис-(2,4-динитрофенилгидразоны). В этом случае оксид магния обрабатывают, нагревая 16 ч в муфельной печи при $525 \pm 25^\circ\text{C}$, а целит 545, с которым его смешивают, сушат 24 ч при 100°C. Соединения наносят на пластинки из этилацетатных растворов и элюирование ведут в направлении, параллельном направлению нанесения суспензии. Элюентом служит смесь ацетон—бензол—метанол; соотношение компонентов подбирают так, чтобы обеспечить лучшее разделение с каждой партией оксида магния. Состав смесей варьирует в пределах от 75:23:2 до 75:15:10. И в этом случае различие в окраске пятен соединений разных классов существенно помогает идентификации. Производные 2,3-дикетона дают фиолетовые пятна, а α -кетоальдегиды и глиоксали — синие. Метод очень чувствителен и позволяет определить от 0,01 до 0,02 мкг диацетил-бис-(2,4-динитрофенилгидразона).

Шварц и др. [44] усовершенствовали свою методику. В новом ее варианте адсорбентом служит смесь оксид магния — целит (3:7). При разделении монокарбонильных соединений пластинки сушат 48 ч на воздухе, а затем элюируют смесью гексан—хлороформ (19:5). Пластинки, предназначенные для разделения дикарбонильных производных, сушат 30 мин на воздухе и час при 100°C, после чего элюируют смесью хлороформ—метанол (19:1). Слои микроцела Т-38 (фирма Johns Manville) готовят из суспензий 15 г адсорбента в растворе 12,5 мл полиоксиэтилена в 70 мл этанола. Пластинки высушивают на воздухе, после чего нагревают 5 мин при 100°C. Производные 1,2-дикетона разделяют смесью бензол—гексан (3:2),

другие производные α -кетонев элюируют этой же смесью, но при соотношении компонентов 1:3; 2,4-ненасыщенные альдегиды элюируют гексаном. Все эти растворители насыщают тем веществом, которым пропитан адсорбент. Гидразоны карбониллов от C_5 до C_{11} хроматографируют на высушенных на воздухе слоях микроцела Т-38, приготовленного на полиэтиленоксиде, который для этого растворяют в 65 мл 1 %-ного раствора гидроксида калия в метаноле. Элюентом служит гексан, насыщенный полиэтиленоксидом.

Кобб [45] также анализировал дикарбонильные бис-производные. В этом случае в качестве адсорбентов использовали смеси сисорб 43 — силикагель G (1:1) и сисорб 43 — целит — сульфат кальция (10:8,5:1,5). Элюентами служили смесь хлороформ — тетрагидрофуран — метанол (15:4:1) и бензол, насыщенный смесью этанолами — 8 %-ный метанол. Окраску пятен усиливали, опрыскивая пластинки 10 %-ным раствором гидроксида калия в этаноле. Кобб и др. [46] применяли также методику Либби и Дейя [47] с обращением фаз: разделение велось на слоях силикагеля, пропитанных минеральным маслом, со смесью диоксан—вода (6:4). Непрерывное элюирование (край пластинки погружен в элюент) обеспечивает хорошее разделение гомологических рядов производных 2,3-дикетонев и насыщенных α -кетоальдегидов.

Примерно в одно время опубликованы две методики систематического разделения 2,4-динитрофенилгидразонов [48, 49]. Хотя эти методики значительно различаются, у них есть ряд общих особенностей; в них сочетаются распределительная и адсорбционная хроматография и используются слои, пропитанные нитратом серебра. Урбах [49] разделял соединения на классы на слоях оксида алюминия G, которые сушил 15 мин при 115°C, после чего до употребления хранил в открытом сосуде. Используя смесь петролейный эфир (30—40°C) — диэтиловый эфир (96:4), можно разделить на соответствующие группы насыщенные нормальные альдегиды, насыщенные нормальные 2-кетоны и нормальные 3-кетоны с ненасыщенной связью в положении 1. Однако первый член каждого ряда кетонев характеризуется величиной R_f , значительно более низкой, чем у других членов ряда. Так, у метилвинилкетона R_f такая же, как и у метилэтилкетона, а у производных ацетона R_f такая же, как у насыщенных альдегидов. Для разделения альдегидов на классы целесообразнее пользоваться реакцией с нитратом серебра, которое образует с ненасыщенными соединениями комплексы.

С помощью методики Урбаха удалось разделить изомерные соединения с одинаковым числом атомов углерода, но различной степенью ненасыщенности. Урбах готовил тонкие слои,

смешивая 30 г оксида алюминия G и 7 г нитрата серебра в 50 мл воды. После того как связующее (алебастр) затвердело, пластинки сушили в печи при 115—135°C. Высушенные пластинки выдерживали на воздухе в течение примерно 12 ч, защитив их от попадания яркого света. Слои, пропитанные нитратом серебра, элюировали смесью петролейный эфир (30—40°C) — диэтиловый эфир (21:4). Используя многократное ($\times 2$) элюирование, в этой системе можно разделить на группы 2,4-ДНФГ-производные насыщенных и ненасыщенных (в положениях 2 и 2 и 4) альдегидов. Сначала лучше удалить производные кетонов, с этой целью первое хроматографирование проводят на слоях оксида алюминия. Члены одного гомологического ряда разделяют методом распределительной хроматографии. Слои кизельгура пропитывают, погружая в 10 %-ный раствор 2-феноксиданола в ацетоне. После удаления ацетона и нанесения проб, растворенных в диэтиловом эфире, проводят элюирование петролейным эфиром (100—120°C). Чтобы улучшить разделение, пробу элюируют несколько раз; так, например, элюируют на 9 см и один, четвертый, раз на расстояние 11 см. Такая методика обеспечивает разделение отдельных членов любого гомологического ряда. Если смеси, однако, содержат члены более чем одного гомологического ряда, возможно перекрывание пятен в одном измерении. При двумерном хроматографировании смеси раствор смешанных 2,4-динитрофенилгидразонов наносят обычным способом в угол пластинки с оксидом алюминия. Элюирование смесью петролейный эфир—диэтиловый эфир (96:4) ведут до края пластинки; таким образом, длина пути разделения составляет примерно 16 см. Пластинку извлекают из камеры, дают растворителю испариться и затем вновь погружают в тот же растворитель и проводят повторное элюирование в том же направлении и на то же расстояние. Затем пластинку извлекают и после испарения растворителя пропитывают, погружая в 10 %-ный раствор феноксиданола в ацетоне. Необходимо следить за тем, чтобы при пропитке не смылись пятна, полученные в результате первого разделения. Ацетон испаряют и проводят разделение в другом направлении петролейным эфиром (100—120°C). На этой первой пластинке удастся идентифицировать все кетоны, за исключением ацетона, который не подчиняется общей закономерности и обнаруживается с низшими альдегидами. Для разделения и идентификации альдегидов готовят вторую пластинку со слоем оксида алюминия G и исходную смесь разделяют на этой пластинке смесью петролейный эфир (30—40°C) — диэтиловый эфир (96:4). Поскольку на второй пластинке необходимо отделить кетоны от альдегидов, для достижения четкого разделения этих соединений может потребоваться многократное (2 и более раз) элюи-

рование. После проведения такой операции альдегиды извлекают, экстрагируя диэтиловым эфиром. Экстракт концентрируют и наносят на пластинку оксида алюминия, пропитанную нитратом серебра. Разделение в первом направлении проводят смесью петролейный эфир (30—40°C) — диэтиловый эфир (21:4). При разделении в другом направлении пластинку сначала пропитывают 10 %-ным раствором феноксиданола в ацетоне и после этого элюируют петролейным эфиром (100—120°C).

Для разделения на классы 2,4-динитрофенилгидразонов Беддингз и Вассинк [48] использовали слои основного карбоната цинка, содержащего в качестве связующего материала амилпектин, а также слои кизельгура, пропитанные нитратом серебра. Если хроматографирование ведется на слоях карбоната цинка, важно, чтобы атмосфера камеры была совершенно сухой, поскольку даже небольшое количество влаги дезактивирует адсорбент. Для устранения влаги пластинки перед употреблением подвергают повторной активации, нагревая полчаса при 110°C. Кроме того, после нанесения пятен пластинки помещают в камеру и пропускают через нее в течение 0,5—1 ч сухой воздух.

На слоях карбоната цинка пробу лучше элюировать смесью петролейный эфир—бензол—пиридин (7:1:2), содержащей 0,1 % абсолютного этанола. В сочетании с кизельгуром, пропитанным нитратом серебра, применяют петролейный эфир (60—70°C). Для разделения соединений одного класса на индивидуальные компоненты в соответствии с длиной углеродной цепи применяют распределительную хроматографию; адсорбентом при этом служит карбонат цинка, пропитанный карбоваксом 400, а элюентом — петролейный эфир (100—120°C). Авторы [48] обнаружили, что пропитанный карбоваксом кизельгур в сочетании с тем же растворителем вполне пригоден для разделений в соответствии с длиной цепи. Величины R_f соединений различных классов, расположенных в порядке увеличения длины цепи, приведены в табл. 20.5.

Если анализируется сложная смесь, сначала проводят, как описано выше, предварительное разделение методом тонкослойной распределительной хроматографии, в результате которого вещества делятся на три группы: с короткой цепью (низкие величины R_f), с умеренно длинной цепью (средние величины R_f) и с длинной цепью (высокие величины R_f). Каждую из этих трех групп разделяют на классы методом адсорбционной хроматографии на слоях карбоната цинка или на слоях кизельгура, пропитанных нитратом серебра. Далее объединенные элюаты фракций с одинаковыми величинами R_f анализируют методом распределительной хроматографии на пластинках со

Таблица 20.5

Величины R_f ДНФГ-производных ряда нормальных углеводов [48] ^а

Число атомов углерода в цепи	ДНФГ-производные ^б				
	алканов	алкеналей-2	алкадиеналей-2,4	алканов-2	алкен-2-онов-4
2	0,05	—	—	—	—
3	0,09	—	—	0,18	—
4	0,13	0,06	—	0,29	—
5	0,17	0,10	—	0,32	0,18
6	0,23	0,15	0,06	0,46	0,43
7	0,28	0,20	0,09	0,55	0,50
8	0,35	0,25	—	0,63	—
9	0,42	0,31	0,12	0,69	—
10	0,49	0,37	—	—	0,77
11	—	0,41	0,22	—	—

^а С разрешения авторов и издателей.

^б Разделение проводилось на пластинках карбоната цинка (250 мкм), пропитанных карбоваксом 400. Степень пропитки 25 %. Подвижная фаза — петролейный эфир с т кип 100—120°C.

слоем карбоната цинка, пропитанным карбоваксом. На этой стадии происходит деление на отдельные компоненты в соответствии с длиной цепи. Такое разделение сложных смесей показано на рис. 20.1. Бедингз исследовал продукты окисления линолеата аммония [50], анализируя их 2,4-ДНФГ-производные на слоях карбоната цинка. Он опубликовал описание камеры с регулируемой атмосферой [51], предназначенной для разделения карбонильных производных, подобных только что описанным.

Байер и Каргл [52] также использовали слои карбоната цинка, но с чистым пиридином для разделения группы из 20 производных на три класса: I) вещества, дающие желтовато-коричневые пятна (R_f от 0,63 до 0,95); II) вещества, дающие розовато-пурпурные пятна (R_f от 0,07 до 0,68, обнаруживающие тенденцию к образованию полос); III) вещества, дающие на слое карбоната цинка пятна от красного до синего или фио-

летнего цвета (R_f от 0 до 0,13). Все вещества третьей группы — бис-производные. Соединения I класса хроматографируют далее на силикагеле смесью этилацетат — гексан (1:4) (а) в одном направлении и ксилолом в другом направлении. Соедине-

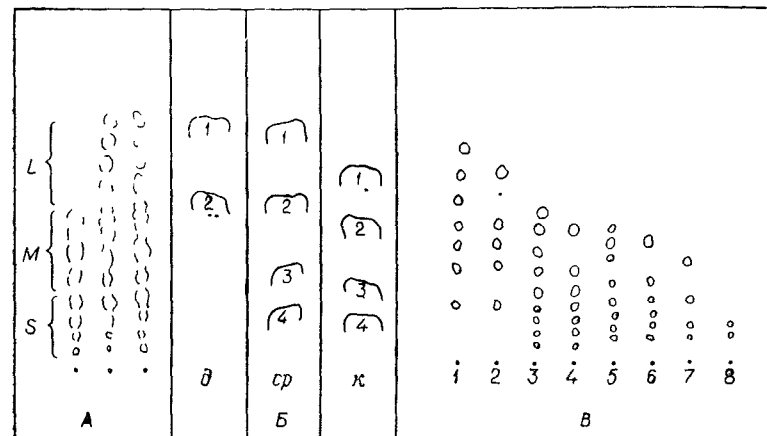


Рис 20.1 Разделение сложной смеси 2,4-ДНФГ-производных [48] (с разрешения авторов и издательства).

A — предварительное разделение методом ТСХ на соединения с длинной (δ), средней (cp) и короткой (k) цепью углеродных атомов B — разделение фракций на классы методом адсорбционной ТСХ B — определение длины углеродной цепи членов каждого из классов методом распределительной ТСХ

1 — контрольная смесь алканов (C_3 — C_9 включительно), 2 — объединенные фракции ($\delta + cp + k$) алканов, 3 — контрольная смесь алкеналей (C_2 — C_{10} включительно), 4 — объединенные фракции ($\delta + cp + k$) алкеналей, 5 — контрольная смесь 2 алкеналей (C_4 — C_{11} включительно) 6 — объединенные фракции ($c_3 + k_3$) 2 алкеналей, 7 — контрольная смесь 2,4-алкадиеналей (C_6 , C_7 , C_9 , C_{11}), 8 — объединенные фракции ($c_4 + k_4$) 2,4 алкадиеналей.

ния II класса разделяют, элюируя смесью (а) в одном направлении и ди-*n*-бутиловым эфиром в перпендикулярном направлении Соединения III класса элюируют смесью лутидин — гексан (1:4)

Мейджбум [53] несколько модифицировал метод Бедингза и Вассинки [48] Он, в частности, изменил концентрацию карбовакса 400 на кизельгуре G до 33,3 %, что улучшило разделение, и повторно анализировал элюат на пропитанном нитратом серебра силикагеле, используя бензол как элюент Величина R_H (скорость элюирования относительно скорости элюирования ДНФГ-гексаналя) определена для 12 насыщенных и 62 ненасыщенных альдегидов и 8 кетонов Мейджбум [53a] разделял ненасыщенные альдегиды и 2,4-ДНФГ-производные метилкетонов на этом же адсорбенте, элюируя пробу смесью четырех-

хлористый углерод — гексан — этилацетат (10:2:1), после чего экстрагировал зоны ДНФГ-производных насыщенных альдегидов C₁₀—C₁₂ и метилкетонов C₈, C₉ и C₁₁.

Краске и Эдвардс [54] применили смесь оксид магния — микроцелл Т38 (2:3) при разделении 2,4-ДНФГ-производных вначале на классы соединений, а затем на отдельные компоненты в соответствии с длиной цепи. После часовой активации слоя при 60°C пробы наносили в виде полос в таком же направлении, в каком наносили пасту. Разделение проводили в перпендикулярном указанному направлению, элюируя пробу смесью петролейный эфир (40—70°C) — хлороформ (17:7) в камере с насыщенной атмосферой. Далее полосы концентрировали, используя правую грань в качестве нижней части хроматограммы. Разделение смесью хлороформ — SVR (4:1) вели до тех пор, пока растворитель не достигал края исходной полосы. Эту операцию повторяли, сжимая в верхней части пластинки ДНФГ-производные в полосы. Третье разделение вели в том же направлении 20 %-ным карбоваксом 400 в хлороформе до тех пор, пока растворитель не поднимался за линию ДНФГ-производных. Пропитанные таким образом пластинки сушили, поворачивали на 180°C и, элюируя петролейным эфиром, разделяли пробу на компоненты в соответствии с длиной цепи. Перед последним хроматографированием можно нанести вдоль неиспользованного края слоя известные вещества. Если перед приготовлением суспензии сушить оксид магния 12 ч при 110°C, тенденция к размыванию задних границ пятен при разделении веществ в соответствии с длиной цепи снижается. Величины R_f уменьшаются в следующем ряду: кетоны > алканы > алкен-2-али > алкадиен-2,4-али. Соединения можно далее дифференцировать по классам, опрыскивая пластинки 10 %-ным раствором гидроксида калия в 80 %-ном этаноле. Алканы окрашиваются в серо-коричневый и коричневый цвета, алкен-2-али — в коричневый и красновато-коричневый, а алкадиен-2,4-али — в розовато-лиловый. Разделение на классы недостаточно четкое; компоненты с самой короткой цепью характеризуются практически такими же величинами R_f , как и компоненты следующего класса.

Авторы [55] для разделения изомеров положения и геометрических изомеров 2,4-динитрофенилгидразонов гексеналей и гептеналей применяли слои силикагеля, пропитанные 30 %-ным раствором нитрата серебра. Элюентом служил бензол. Денти и Лубоц [56] применяли слои силикагеля и оксида алюминия, пропитанные нитратом серебра, а также необработанные адсорбенты и смеси бензол — петролейный эфир (40—70°C) (3:2), бензол-*n*-гексан (1:1), хлороформ — петролейный эфир

(3:1), а также циклогексан — нитробензол — петролейный эфир (6:3:2) для анализа группы карбонильных соединений.

Нано и Санцин [57] разделили группу низкомолекулярных производных карбониллов на нейтральном оксиде алюминия (Woelm), элюируя пробу смесью циклогексан — нитробензол (2:1) или гексан — хлороформ — нитробензол (8:2:1); Нано [58] распространил этот метод и на другие соединения. Предложена методика количественного определения, предусматривающая извлечение разделенных компонентов хлороформом с последующим измерением поглощения элюата. В табл. 20.6 приведены величины R_f различных соединений, исследованных в шести различных растворителях.

Джарт и Биглер [59] приводят величины R_f , отнесенные к бутанолу, для 70 ДНФГ-производных, полученные на оксиде алюминия со смесью этилацетат — петролейный эфир (62—82°C), насыщенный водой (3:20). Корэ и др. [60] хроматографировали группу производных смесями *n*-гексан — этанол (17:3) или *n*-гептан — этанол (4:1) на слоях оксида алюминия со степенью активности II или IV.

Бирн [61] в своей работе подчеркивает, насколько важно, чтобы стартовое пятно было маленьким. Когда нерастворимое вещество, например *трис*-(ДНФГ)-мезоксальдегид, наносят на пластинку из смеси летучих растворителей, вещество часто осаждается на адсорбенте и при последующем элюировании остается в исходной точке или распределяется в виде полосы. В такой ситуации рекомендуется использовать в качестве растворителя пробы нитробензол; его удаляют повторным элюированием петролейным эфиром (80—100°C), который смещает нитросоединения к верхнему краю пластинки, откуда эти соединения перед обнаружением хроматограммы удаляют. Бирн провел хроматографический анализ группы из 41 карбонильного производного на силикагеле G и оксиде алюминия со смесями петролейный эфир (80—100°C) — диэтиловый эфир (7:3), бензол — тетрагидрофуран (от 98:2 до 7:3) и бензол — тетрагидрофуран — уксусная кислота (15:9:1). Соединения, не полностью разделяющиеся при хроматографировании обычным методом, анализируют горизонтальной ТСХ. Пластинки опрыскивают этаноламином, который дает более характерное и более прочное окрашивание, чем гидроксид натрия или калия.

Либби и Дей [47] анализировали некоторые нормальные насыщенные альдегиды и кетоны методом хроматографии с обращением фаз на слоях силикагеля, пропитанных минеральным маслом. Пропитку слоев проводили, погружая пластинки в 10 %-ный раствор минерального масла в петролейном эфире. Для элюирования применяли смесь диоксан — вода (13:7). В тех случаях, когда необходимо было дополнительное разделение,

Таблица 20.6

Величины R_{st}^a 2,4-ДНФГ-производных ряда карбонильных соединений, полученные в различных растворителях [58] ^b

Карбонильное соединение	Нитробензол—хлороформ—гексан (1:2:8)	Диэтиловый эфир—петролейный эфир (т. кип. 40—70°C) (2,5:7)	Этилацетат—гексан (1:9)	Нитробензол—четырехлористый углерод (1:9)	Нитробензол—циклогексан (1:2)	Нитробензол—четырехлористый углерод (1:2)
Формальдегид	0,70	0,52	0,52	0,74	0,80	0,84
Ацетальдегид	0,86	0,69	0,69	0,84	0,94	0,92
Пропионовый альдегид	0,97	0,95	0,96	0,96	0,98	1,00
Масляный альдегид	1,10	1,11	1,09	1,05	—	—
n-Валериановый альдегид	1,16	1,19	1,21	1,08	—	—
Коричный альдегид	1,22	1,26	1,26	1,12	—	—
Энантовый альдегид	1,27	1,30	1,31	1,14	—	—
Каприловый альдегид	1,30	1,34	1,34	1,17	—	—
Гликолевый альдегид	0,04	0	0	0,02	0,06	0,05
Глиоксаль ^в	0,10	0	0	0,17	0,67	0,42
Гликолевая кислота	0	0	0	0	0	1
Акриловый альдегид	0,86	0,92	0,91	0,93	—	1,01
Глицериновый альдегид	—	—	—	0,95	—	0,07
Диоксиацетон	—	—	—	—	0,72	0,65
Ацетон	1	1	1	1	1	1
Пировиноградная кислота	0	0	0	0	0	0
Мезоксалева кислота (диэтиловый эфир)	—	—	—	0,72	—	0,87

^a $R_{st} = R_f(\text{соединение})/R_f(\text{производное ацетона})$.

^b С разрешения автора и Elsevier Publishing Co.

^в R_{st} озонов.

применяли метод непрерывного их хроматографирования, протягивая пластинки через щель крышки Сарана. Анет [62], изучал разложение углеводов и выделил некоторые оксипроизводные карбонильных соединений. Хроматографирование он проводил на слоях оксида алюминия и силикагеля, элюентом служили толуол и смесь толуола и этилацетата. В работе [62] приведены величины R_f 16 соединений.

Описано хроматографическое разделение замещенных ДНФГ-производных бензальдегида на полосках силикагеля (фирма Eastman Chromatogram) и на силикагеле G, нанесенном на стеклянные пластинки, с использованием в качестве элюента бензола [63] и на карбонате цинка с применением смеси сероуглерод—хлороформ (9:1) [64]. Ямадзаки и др. [65] анализировали эти соединения методом двумерного хроматографирования на кизельгуре. Для первого направления слои пропитывали 5—20 %-ным полиэтиленгликолем (ПЭГ-200) и элюировали пробы смесью циклогексан—диэтиловый эфир (7:3). Затем пластинки пропитывали 10 %-ным раствором тетралина в петролейном эфире и элюировали в перпендикулярном направлении смесью 90 %-ный метанол—бензол—уксусная кислота—диметилформамид (10:1:1:1). В сочетании с этой же смесью растворителей использовали также кизельгур, пропитанный диметилформамидом в одном направлении и тетралином—в другом. Такеучи и др. [66] исследовали влияние предварительно адсорбированных растворителей на величины R_f карбонильных соединений.

Стереоизомеры замещенных ДНФГ-производных бензофенона разделяли на необработанном силикагеле [67, 68] и на силикагеле, пропитанном диметилформамидом [69]. α -Замещенные ДНФГ-производные карбонилы анализировали хроматографически на оксиде алюминия, пропитанном нитратом серебра [70]. Некоторые производные с разветвленной углеродной цепью удается таким способом отделить от неразветвленных производных с такой же длиной цепи. Денти и Лубец [71] приводят величины R_f 17 производных, полученные на оксиде алюминия и силикагеле с пропиткой и без пропитки нитратом серебра с четырьмя элюентами. В работе Бруммера и Меллера-Пеннинга [72] даны величины R_s , отнесенные к цинковому желтому, для 247 производных, разделенных на силикагеле G смесью петролейный эфир (40—60°C) — хлороформ — этилацетат (30:3:1). Описаны также анализы 2,4-ДНФГ-производных, включая бис-гидразоны дикарбонилы [73], 32 ароматических кетонов и альдегидов (табл. 20.7) [74], циклокетонов [75, 76], алифатических ненасыщенных альдегидов [77], карбонильных соединений в спиртных напитках [78—82] и фенольных карбонильных соединений [33, 83] (см. также т. 2, гл. XXX, разд. 3).

Таблица 20.7

Величины R_f и R_{st} (отнесенные к вератровому альдегиду) $\times 100$
 2,4-ДНФГ-производных некоторых ароматических карбоксильных соединений,
 полученные на слоях силикагеля с добавкой крахмала в качестве связующего.
 Растворитель: этилацетат—петролейный эфир (75—120°C) (1:2);
 длина пути разделения 14 см [47]^a

2,4-ДНФГ-производное	$R_f \times 100$	$R_{st} \times 100$
Бензальдегид	60	177
Салицилальдегид	48	141
<i>m</i> -Оксибензальдегид	32	94
<i>n</i> -Оксибензальдегид	30	88
Протокатехиновый альдегид	2	6
2,4-Диоксибензальдегид	23	68
2,5-Диоксибензальдегид	21	62
Анисовый альдегид	48	141
<i>o</i> -Метоксибензальдегид	49	144
<i>m</i> -Метоксибензальдегид	50	147
Ванилин	23	68
Сиреневый альдегид	5	15
3-Этокси-4-оксибензальдегид	32	94
Изованилин	23	68
<i>o</i> -Ванилин	32	94
Вератровый альдегид	34	100
2,4-Диметоксибензальдегид	41	121
3,5-Диметоксибензальдегид	47	138
2,5-Диметоксибензальдегид	45	133
2,3-Диметоксибензальдегид	47	138
<i>n</i> -Этоксибензальдегид	53	156
Ацетилванилин	33	97
4-Этокси-3-метоксибензальдегид	42	124
Коричный альдегид	60	177
<i>n</i> -Кумаровый альдегид	33	97
Кониферилловый альдегид	27	80
Горчичный альдегид	15	44
<i>n</i> -Оксибензилацетон	32	94
<i>n</i> -Метоксибензилацетон	49	144
Ацетованилон	23	68
Ацетосиреневый кетон	0	0
2,4-Диоксиацетофенон	26	76

^a С разрешения автора и Elsevier Publishing Co.

Эдвардс [83a] разделил изомеры ДНФГ-производных нормальных альдегидов от C_3 до C_9 на кизельгуре G, пропитанном 2-феноксиэтанолом, с гептаном в качестве растворителя.

Оксимы

Пежкович-Тадич и др. [84—87] исследовали разделение методом ТСХ изомерных пар оксимов (табл. 20.8). Этот метод оказался удобным для выделения чистых изомеров, которые часто трудно выделить другим способом, например кристалли-

Таблица 20.8

Величины $R_f \times 100$ изомерных оксимов, полученные на силикагеле G со смесью бензол—этилацетат (5:1). Длина пути разделения 14 см (для алифатических соединений $\times 2$) [84—86]

Соединение	Изомеры	
	<i>син</i>	<i>анти</i>
<i>n</i> -Толуальдоксим	54	33
<i>n</i> -Анисальдоксим	42	27
<i>n</i> -Куминальдоксим	54	37
<i>o</i> -Нитробензальдоксим	47	40
<i>m</i> -Нитробензальдоксим	52	35
<i>n</i> -Нитробензальдоксим	53	34
Бензальдоксим	50	32
Бензоиндоксим	14	37
Анизоиндоксим	5	23
Формальдоксим	45,0	
Ацетальдоксим	16,4	9,3
Пропиональдоксим	48,6	42,8
Бутиральдоксим	50,7	44,3
Валеральдоксим	54,3	46,4
Гексанальдоксим	57,1	47,8
Гептанальдоксим	60,0	50,0
Октанальдоксим	62,9	51,4
Нонанальдоксим	65,7	53,6
Деканальдоксим	68,6	55,7
Изобутиральдоксим	57,1	47,1
Изовалеральдоксим	52,8	45,7

защией. Изомерные соединения хроматографировали на слоях силикагеля G, элюируя смесью бензол—этилацетат (5:1). Нанесение проб на пластинки проводили из раствора в тетрагидрофуране. Для обнаружения оксимов пластинку опрыскивали 0,5 %-ным раствором хлорида меди. α -Бензальдоксим не дает цветной реакции с этим реактивом, однако в результате опрыскивания пластинки насыщенным спиртовым раствором моногидрата ацетата меди с последующим 10-минутным нагреванием при 100°C появляется зеленое окрашивание. Алифатические оксимы обнаруживают иодом; исключение составляет лишь *син*-ацетальдоксим, который обнаруживают спиртовым раствором нитрата серебра. Тоул и др. [88] приводят список 13 растворителей, предназначенных для разделения различных групп моно- и диоксимов diketонов на силикагеле. Унтерхальт [89—92] опубликовал ряд работ по ТСХ ненасыщенных оксимов. Для разделения он использовал силикагель G и смесь бензол—этилацетат (3:1).

Прочие производные

Корэ и Иванова [93] анализировали хроматографически бисульфитные производные карбонильных соединений на силикагеле, элюируя их смесью бензол—этанол (17:3); обнаружение в этом случае они проводили 2,4-динитрофенилгидразином. Кемп и О'Брайен [94] разделяли семикарбазоны наиболее распространенных альдегидов на силикагеле, используя девять различных смесей растворителей. В работе [95] описана методика разделения изоникотингидразонов на силикагеле с шестью растворителями. Одной из лучших оказалась смесь бензол—этанол—этилацетат (2:1:1). Соединения обнаруживали 0,5 %-ным раствором иода в хлороформе. Чтобы дифференцировать изомерные оксибензальдегиды, хроматограмму обрабатывали 1 %-ным раствором хлорида железа. Авторы работы [96] разделили группу изоникотингидразонов на слое оксида алюминия, используя смесь гексан—ацетон (5:3). 4-Нитрофенилгидразоны 28 ароматических карбониллов хроматографировали на силикагеле с дихлорметаном, смесью бензол—метанол (19:1), бензолом и смесью этилацетат—гексан (1:1) [97]. Получаемые при этом пятна видны и в обычном свете, но опрыскивание гидроксидом калия дает характерное окрашивание.

Другую группу этих производных, главным образом алифатических, анализировали на силикагеле со смесью бензол—петролейный эфир (38—50°C) (4:1) и на полиамиде со смесью метанол—вода (19:1) [98]. 2-Дифенилацетил-1,3-индандион-1-гидразоны 49 карбонильных соединений всех типов анализи-

ровали хроматографически на силикагеле [99]. В указанной работе приведены величины R_f алифатических альдегидов, замещенных бензальдегидов и ацетофенонов, 9-акридон и ацетона, полученные при элюировании смесью хлороформ—гексан (1:1). Другие соединения элюировали смесью этих же растворителей, но при соотношении компонентов 2:1. Простые азины хроматографически разделяли на силикагеле с бензолом, смесью гексан—этилацетат (1:1) и бензол—парафин—уксусная кислота—вода (11:4:9:6) [100]. Гидразоны 2-гидразин-бензотиазола использовали, чтобы отличить альдегиды от кетонов [101]. Разделение производных проводили на силикагеле смесью петролейный эфир (30—40°C)—этилацетат—уксусная кислота (44:5:1) в камере с насыщенной атмосферой. Слои опрыскивали сначала 0,1 %-ным спиртовым раствором фторбората *n*-нитробензолдиазония, а затем 10 %-ным спиртовым раствором гидроксида калия. Кетоны не образуют окрашенных продуктов реакции. 2,4-Динитрофенилсемикарбазоны 25 карбонильных соединений анализировали хроматографически на полиамиде, элюируя смесью метанол—вода (19:1), и на силикагеле G, элюируя смесью гептан—бензол (4:1) [98].

ЛИТЕРАТУРА

- Marcuse R., J. Chromatogr., 7, 407 (1962).
- Marcuse R., Mobeck-Hanssen U., Goethe P.-O., Fette, Seifen, Anstrichm., 66, 192 (1964).
- Mahadevan V., Viswanathan C. V., Lundberg W. O., J. Chromatogr., 24, 357 (1966).
- Борднер М., Виноградова Л. Р., Завьялов С. И., Изв. АН СССР, сер. хим., 1961, 162.
- Kucera J., Collec. Czech. Chem. Commun., 28, 1341 (1963).
- Saitoh K., Suzuki N., J. Chromatogr., 92, 371 (1974).
- Dhar D. N., Mistra S. S., J. Chromatogr., 69, 416 (1972).
- Dhar D. N., J. Chromatogr., 67, 186 (1972).
- Petrowitz H.-J., Z. Anal. Chem., 183, 432 (1961).
- Heřmánek S., Schwarz V., Cekan Z., Pharmazie, 16, 566 (1961).
- Prey V., Berbalk H., Kausz M., Mikrochim. Acta, 1962, 449.
- Chawla H. M., Chibber S. S., Khera U., J. Chromatogr., 111, 246 (1975).
- Saleh N. A. M., J. Chromatogr., 92, 467 (1974).
- Arends P., J. Chromatogr., 47, 550 (1970).
- Knappe E., Peteri D., Rohdewald I., Z. Anal. Chem., 197, 364 (1963).
- Durišínova L., Belluš D., J. Chromatogr., 32, 584 (1968).
- Libosvar J., Nedbal J., Hach V., Cesk. Farm., 11, 73 (1962).
- Хейфиц Л. А., Молдованская Г. И., Шулов Л. М., Журнал аналит. хим., 18, 267 (1963).
- Корэ С. А., Шепеленкова Е. И., Чернова Е. М., Маслобойное и жировое дело, 28, 32 (1962).
- Rao P. V., Ramachandran S., Cornwell D. G., J. Lipid Res., 8, 380 (1967).
- Кулоневиц В. Г., Зеликман З. И., Эфендиева Н. Ф., Изв. высш. учебн. зав. Пищевая промышленность, 1971, 168.

- 21a *Viswanathan C V, Phillips F, Lundberg W O*, J Chromatogr, **30**, 237 (1967)
- 22 *Klouwen M H, ter Heide R, Kok J G J*, Fette, Seifen, Anstrichm, **65**, 414 (1963)
- 23 *Onoe K*, J Chem Soc Japan, Pure Chem Sect, **73**, 337 (1952)
- 24 *Kirchner J G, Muller J M, Keller G J*, Anal Chem, **23**, 420 (1951)
- 25 *Labat L, Montes A L*, Anales Assoc Guim Arg, **41**, 166 (1953), Chem Abstr, **48**, 3637 (1954)
- 26 *Rosmus J, Deyl Z*, J Chromatogr, **6**, 187 (1961)
- 27 *Bordet C, Michel G*, Compt Rend, **256**, 3482 (1963)
- 28 *Pailer M, Kuhn H, Gruenberger I*, Fachliche Mitt Oesterr Tabakregie, **1962**, 33
- 29 *Rink M, Herrmann S*, J Chromatogr, **2**, 249 (1963)
- 30 *Dhont J H, de Rooy C*, Analyst (London), **86**, 74 (1961)
- 31 *Mehlitz A, Gierschner K, Minas T*, Chem-Ztg, **87**, 573 (1963)
- 32 *Авинен Е. М., Фаворская И. А.*, Вестн Ленингр ун-та, **18**, сер физ и хим, 122 (1963)
- 33 *Wildenhain W, Henseke G*, Chimia, **20**, 357 (1966)
- 34 *Zahn H, Wuerz A*, Z Anal Chem, **134**, 183 (1951)
- 35 *Ronkainen P, Brummer S*, J Chromatogr, **27**, 374 (1967)
- 36 *Craske J D, Edwards R A*, J Chromatogr, **57**, 265 (1971)
- 37 *Schwartz D P, Haller H S, Keeney M*, Anal Chem, **35**, 2191 (1963)
- 38 *Craske J D, Edwards R A*, J Chromatogr, **51**, 237 (1970)
- 39 *Szonyi*, referred to in Ref 36
- 40 *Schwartz D P, Johnson A R, Parks O W*, Microchem J, **6**, 37 (1962)
- 41 *Шевченко З. А., Фаворская И. А.*, Вестн Ленингр ун-та, **19**, сер физ и хим, 107 (1964)
- 42 *Schwartz D P, Parks O W*, Microchem J, **7**, 403 (1963)
- 43 *Schwartz D P, Keeney M, Parks O W*, Microchem J, **8**, 176 (1964)
- 44 *Schwartz D P, Shamey J, Brewington C R, Parks O W*, Microchem J, **13**, 407 (1968)
- 45 *Cobb W Y*, J Chromatogr, **14**, 512 (1964)
- 46 *Cobb W Y, Libbey L M, Day E A*, J Chromatogr, **17**, 606 (1965)
- 47 *Libbey L M, Day E A*, J Chromatogr, **14**, 273 (1964)
- 48 *Badings H T, Wassink J G*, Neth Milk Dairy J, **17**, 132 (1963)
- 49 *Urbach G*, J Chromatogr, **12**, 196 (1963)
- 50 *Badings H T*, J Am Oil Chem Soc, **36**, 648 (1959)
- 51 *Badings H T*, J Chromatogr, **14**, 265 (1964)
- 52 *Beyer C F, Kargl T E*, J Chromatogr, **65**, 435 (1972)
- 53 *Meijboom P W*, J Chromatogr, **24**, 427 (1966)
- 53a *Meijboom P W*, Fette Seifen, Anstrichm, **70**, 477 (1968)
- 54 *Craske J D, Edwards R A*, J Chromatogr, **51**, 237 (1970)
- 55 *Meijboom P W, Jurrrens G*, J Chromatogr, **18**, 424 (1965)
- 56 *Denti E, Luboz M P*, J Chromatogr, **18**, 325 (1965)
- 57 *Nano G M, Sancin P*, Experientia, **19**, 323 (1963)
- 58 *Nano G M*, "Thin Layer Chromatograph of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of Aliphatic Carbonyl Compounds and their Quantitative Determination", in Thin Layer Chromatography, G B Marini-Bettolo, Ed, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 138
- 59 *Jart A, Bigler A J*, J Chromatogr, **23**, 261 (1966)
- 60 *Корэ С. А., Рейнгад Е. И., Шепленкова Е. И., Чернова Е. М., Иванова Р. П.*, Труды Всесоюзного научно-иссл ин-та синтетич и натуральных душистых веществ, **7**, 141 (1965)
- 61 *Byrne G A*, J Chromatogr, **20**, 528 (1965)
- 62 *Anet E F L, J*, J Chromatogr, **9**, 291 (1962)
- 63 *Finley K T, Gilman R E*, J Chromatogr, **22**, 36 (1966)
- 64 *Eisenberg W C, Gilman R E, Finley K T*, J Chromatogr, **44**, 569 (1969)
- 65 *Yamazaki Y, Suzuki Y, Takeuchi T*, Bunseki Kagaku, **21**, 1223 (1972), through Chem Abstr, **78**, 11275e (1973)
- 66 *Takeuchi T, Suzuki Y, Okazaki H*, Bunseki Kagaku, **21**, 1149 (1972), through Chem Abstr, **78**, 11270z (1973)
- 67 *Tscheiter L*, Proc S D Acad Sci, **43**, 165 (1964), through Chem Abstr, **63**, 8165b (1965)
- 68 *Reimann E*, Proc S D Acad Sci, **43**, 170 (1964), through Chem Abstr, **63**, 8165b (1965)
- 69 *Petrowitz H J*, J Chromatogr, **40**, 462 (1969)
- 70 *Sloot D*, J Chromatogr, **24**, 451 (1966)
- 71 *Denti E, Luboz M P*, J Chromatogr, **18**, 325 (1965)
- 72 *Bruemmer J-M, Mueller-Penning T J*, J Chromatogr, **27**, 290 (1967)
- 73 *Ronkainen P*, J Chromatogr, **27**, 380 (1967)
- 74 *Ruffini G*, J Chromatogr, **17**, 483 (1965)
- 75 *Slentz R D, Gilman R E, Finley K T*, J Chromatogr, **44**, 563 (1969)
- 76 *Petrowitz H-J*, Chem-Ztg, **94**, 883 (1970)
- 77 *Meijboom P W, Jongenotter G A*, Fette, Seifen, Anstrichm, **77**, 135 (1975)
- 78 *Ronkainen P, Suomalainen H*, Suom Kemistil B, **39**, 280 (1966)
- 79 *Ronkainen P, Arkima V, Soumalainen H*, J Inst Brewig, **73**, 567 (1967)
- 80 *Ronkainen P P, Brummer S, Soumalainen H*, J Chromatogr, **28**, 270 (1967)
- 81 *Palamand S R, Nelson G D, Hardwick W A*, Proc Am Soc Brew Chem, **1970**, 186, through Anal Abstr, **22**, 1178 (1972)
- 82 *Palamand S R, Markl K S, Hardwick W A*, Proc Meet Am Soc Brew Chem, **1971**, 211, through Anal Abstr, **74**, 1196 (1973)
- 83 *Froment P, Robert A*, Chromatographia, **4**, 173 (1971)
- 83a *Edwards H M, Jr*, J Chromatogr, **22**, 29 (1966)
- 84 *Hranisavljevic-Jakovljevic M, Pejkoivic-Tadic I, Stojkovic A*, J Chromatogr, **12**, 70 (1963)
- 85 *Pejkoivic Tadic I, Hranisavljevic Jakovljevic M*, Se Nešic S, "Thin-Layer Chromatography of Isometric Oximes, II", in Thin-Layer Chromatography, G B Marini Bettolo, Ed, Elsevier, Amsterdam, 1964, p 160
- 86 *Pejkoivic-Tadic I, Hranisavljevic-Jakovljevic M, Nešic S*, J Chromatogr, **21**, 239 (1966)
- 87 *Nešic S, Nikić Z, Pejkoivic-Tadic I, Hranisavljevic Jakovljevic M*, J Chromatogr, **76**, 185 (1973)
- 88 *Toul J, Padria J, Okač J*, J Chromatogr, **57**, 107 (1971)
- 89 *Unterhalt B, Pindur U*, Arch Pharm (Weinheim, Ger), **306**, 813 (1973)
- 90 *Unterhalt B*, Arch Pharm (Weinheim, Ger), **299**, 274 (1966)
- 91 *Unterhalt B*, Arch Pharm (Weinheim, Ger), **299**, 626 (1966)
- 92 *Unterhalt B*, Arch Pharm (Weinheim, Ger), **303**, 661 (1970)
- 93 *Корэ С. А., Иванова Р. П.*, Труды Всесоюзного научно-иссл ин-та синтетич и натуральных душистых веществ, **7**, 146 (1965)
- 94 *Camp B J, O'Brien F*, J Chromatogr, **20**, 178 (1965)
- 95 *Vasilkiotis G S, Canavis A*, Anal Lett, **963** (1968)
- 96 *Hashmi M H, Shahid M A*, Mikrochim Acta, **1968**, 1045
- 97 *Barber E D, Sawicki E*, Anal Chem, **40**, 984 (1968)
- 98 *Tumlinson J H, Minyard J P, Hedin P A, Thompson A C*, J Chromatogr, **29**, 80 (1967)
- 99 *Pietrzyk D J, Chan E P*, Anal Chem, **42**, 37 (1970)
- 100 *Barber E D*, J Chromatogr, **27**, 398 (1967)
- 101 *Hunt F C*, J Chromatogr, **40**, 465 (1969)

РЕАКТИВЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЛИ СОЕДИНЕНИЙ ОПРЕДЕЛЕННОГО ТИПА

	Номер реактива *
Аденин и его производные	111, 273
Адреналин и его производные	85, 200
Алкалоиды	22, 51, 53, 55, 90, 111, 112, 148, 149, 190, 209
Алкалоиды пирролизидиновые	244
Алоэ (соединения, содержащиеся в алоэ)	83
Альдегиды	77, 96, 128, 137, 140, 223
полиеновые	
Альдозы	35, 97
Амид никотиновой кислоты	5, 61
Амиды	48
Аминокислоты	152, 153, 176, 177, 178, 198, 205, 267
первичные	128
серусодержащие	147, 237
Аминосакхара	11, 177
Амины	88, 177
алифатические	238, 239
вторичные	238
ароматические	68, 78, 79, 120, 129, 139, 181, 184, 201, 206, 236, 249, 252
первичные	58, 62, 78
вторичные	58, 128
Амфетамины	264
Анионы	24
серусодержащие	226
Антиоксиданты	85, 121, 179, 195
Антоцианидины	8
Антрахиноны	116
Арбу тин	166
Аргинин	239, 271
Арил-N-метилкарбаматы	181
Арилоксиамины	62
Арсенат и арсенит	226
Ацетаты сахаров	144
Ацетилена производные	86, 185
Ацетокси- и метоксиртутные производные	104
Ацильные производные сахаров	225

* Указаны номера реактивов, перечисленных в гл 7 Дополнительные обнаруживающие реактивы, применяемые при хроматографировании соединений различных типов, указаны в тексте соответствующих глав и разделов

Барбитураты	67, 161, 166, 224 228, 264
с двойными связями в боковой цепи при С-5	46
Белки	3, 128, 169, 170, 181, 199, 261
Биотин	61, 84, 209
Буфадииенолиды	57
Ванилин	140
Витамин В ₁	200
В ₆	84
Е	108
Витамины В	61
водорастворимые	149
жирорастворимые	30, 31, 121
Восстановители	24, 108, 197, 201, 212, 226, 255, 267
Вулканизации ускорители	46
Галоген анионы (за исключением фтора)	43, 226
Гексозофосфаты	15, 194, 247
Гербициды	41, 43, 91, 222, 227
галогенированные феноксикислоты	43
производные мочевины	91, 222
триазиновые	41
Гетероциклические соединения	134, 165, 249, 253
Гибберелины	53
Гидрастин	64
Гидроксильные группы	182
Гидрохиноны	108, 166
Гидразины метилированные	131
Гликозиды стероидные	31, 155
Гликолипиды	39, 98, 243
α-Гликольные группировки	226
Гликофлавоны	8
Глицериды	222
Гомоаргинин	271
Гуанидогруппы	239, 271
Глюкозидуронаты	218
2-Дезоксисахара	76
4-Диметиламиноазобензол	141
3,5-Динитробензамиды	173
3,5-Динитробензоаты	173
2,4-Динитрофениламиноокислоты	184
2,4-Динитрофенилгидразоны	201, 233
1,2-Диолы	157
Дипептиды	176
Дисульфиды	237
Дифениламин	49
Диэтанолламин	238
N,N-Диэтил-D-лизергамид (ЛСД)	89
Добавки, предохраняющие пищевые продукты от порчи	222
Железа(III) ионы	2, 142, 145, 203, 206, 220

Имидазолы	68
Имиды	48
Иминокислоты	152
Индолы	50, 65, 132, 181
Иодиды органические	55
Иодаминокислоты	122
Калий	70
в больших концентрациях	276
Каннабидиол	34, 115
Каннабидиоловая кислота	34
Карбазолы	79, 80
Карбаматы	91, 274
Карбобензоксаминоокислоты	61
Карбоксин	229
Карбонилы	95
Карбромаль	161
Каротиноиды	31
Катехоламины	85, 114, 180, 181, 200, 249
Катионы группы H ₂ S	206
Катионы неорганические	2, 103, 109, 110, 142, 145, 188, 203, 215, 219, 220, 253
Катионы тяжелых металлов	103, 110, 203
Кетозы	29, 96, 97
Кетокислоты	82
Кетоны	77, 96
Кетостероиды	95, 154
Δ ⁴ -3-Кето-C ₂₁ -стероиды	6, 33
Кислота каннабидиоловая	34
никотиновая	5
фолиевая	174
Кислоты гидроксамовые	118
дикарбоновые	43
дифосфорные	16
желчные	26, 52, 160, 216
жирные	71
метоксикоричные	8
монофосфорные	16
оксикоричные	8
полиеновые	192
уроновые	28
фенолкарбоновые	131
Кобальт	2, 109, 145, 215, 256
Колхицин	55
Кофеин	56, 59, 61, 166
Креатин и креатинин	239
Кумарины	102, 104
Лактамы	112
Лактоны	144
Лекарственные средства (различные)	264
анестезирующие	264
мочегонные	75, 235, 240, 264

противогистаминные	21, 264
психотропные	65, 264
сердечные гликозиды	57, 155, 262, 263
Липиды	47, 66, 81, 98, 112, 138, 186, 195, 197, 209, 222
Липопротеины	248a
Литий	2, 276
ЛСД см N, N-Диэтил-D-лизергилгамид	.
Масла эфирные см. Терпены	
Медь	2, 203, 215, 256
Ментофуран	262
Меркаптаны	237
Металлы	
щелочноземельные	1, 145
щелочные	1
Метанол в этаноле	246
Метасистокс	74
3,4-Метилendioксифенильные соединения	64, 136
Метионин	241
Метиприлон	161
Моноглицериды ненасыщенные	192
Моно- и диэфиры фосфорные и тиофосфорные	79
Морфолин	238
Мочегонные средства тиазидные	235
Мукополисахариды	261
Наперстянки гликозиды	25, 57, 63, 155, 262
Наркотики	264
Натрий	276
Нафтохиноны	175
Ненасыщенные соединения	130, 186, 188
Неомицины	239
Никель	93, 256
Нитрозамины	100
Нитрозодифениламины	88
Нитропроизводные	88
ароматические	204, 247
органические	111, 112, 148
Нитрофенолы	45
Оксибензофенолы	117
Оксимы	73
Оксикатолы	65, 89, 90, 264
Олова соли органические	110, 217
Органотиофосфаты	251
Основания прочные	90
пуриновые и пиримидиновые	
алкилированные	61
Основные соединения с первичными аминными или реакционноспособными метиленовыми группами	235

Пенициллины	147, 150
Пептиды циклические	48, 198
Пероксиды	20, 94, 207
устойчивые	128
Персульфаты	35
Пестициды	101, 124, 189, 230
карбаматы	274
органические сульфиты	159, 265, 266
фосфорорганические	16, 19, 44, 113, 124, 165, 183
хлорсодержащие	35, 94, 99, 101, 173, 226, 229, 230, 231, 260
хлорфенольные эфиры	252
Пиперонилбутоксид	250
Пиразолы	118
Пиразолы	237
Пиретрины	250
Пиридиновые соединения	5
Пиридоксин	61
α - и γ -Пироны	102
Пластификаторы	180, 221, 258, 274
Полиацетиленовые соединения	86
Полисахариды	66
Полиспирты	12, 254, 257
Полифенилы	54
Полиэтиленгликоли	112, 148
Простагландины	27
Пурины	56, 61
Реактивы общего назначения	61, 213, 222
Рибофлавин	61
Ртутные ионы	2, 203
Сапогенины	63, 276
стероидные	30, 31, 190, 276
Сахара	7, 23, 26, 157, 162, 171, 225, 242, 259
восстанавливающие	10, 24, 28, 226, 267
Серы соединения	80, 241
ароматические	241
Силикаты	18
Синергенты, 3,4-метилendioксибензил	136
Синергические добавки к инсектицидам	64
Систокс	74
Смолы	30
Соли желчных кислот	216
олова органические	110, 217
Спирты высшие	274
сахаров	157, 242
Стерины	63, 172, 197
Стероиды	22, 26, 32, 63, 106, 143, 154, 158, 163, 172, 186, 195, 197, 202, 211, 262, 267, 268, 269, 272, 274, 275, 276

восстанавливающие	255
ненасыщенные	158
α , β	112
фенольные	120
Стрептомицины	239
Сульфопрепараты лекарственные	264
Сульфаты стероидные	163
Сульфгидрильные группы	79
Сульфиды	147, 252
Сульфоксиды, сульфоны	252
Сульфонамиды	78, 90, 92, 174, 236
Терпеновые спирты, карбонильные соединения, простые и сложные эфиры, углеводороды и оксиды	105
Терпены	26, 30, 31, 63, 158, 195, 248, 274
Тестостерона производные	96
Тиамин	61
Тиоцианат-ионы	118
Тиолы	237
Тиомочевина	79, 239
Тиофена производные	151
Тиофосфаты	44, 124, 189
Токоферолы	108, 121
Триалкилфосфаты	68
Триозофосфорной кислоты производные	15, 194, 247
Триптамин	120
Тритиофторбензальдегиды	72
Тяжелых металлов ионы	2, 103, 215
Углеводороды хлорированные <i>см.</i> Пестициды	134, 252
хлорсодержащие	134, 252
Углеводы	7, 9, 10, 23, 24, 27, 157, 171, 193, 259
Уран	2, 203, 219
Фенилгидразоны сахаров	162
Фенилмочевинные производные	91
Фенилозаны сахаров	249
Фенилтиогидантоины	147
Феноксикислоты галогенированные	222
Фенолы	22, 36, 40, 50, 79, 84, 108, 115, 116, 117, 118, 120, 124, 131, 166, 180, 181, 245, 249, 252, 274
кроме <i>para</i> -замещенных галогенированные	264
терпеновые	45
Фенотиазины	118, 226
89, 118, 119, 133, 189, 190, 195, 209	
Ферри- и ферроцианид-ионы	118
Флаванолы	8, 102
Флавоноиды	156

Флавоны	8
Фосфат- и фосфит-ионы	19, 226
Фосфатные группы в липидах	125
Фосфолипиды	14, 125, 167, 196, 234
Фосфорорганические соединения	17, 41, 68
Фунгициды	
органические ртутьсодержащие	229
органортутные	110
системные	112, 208
Хальконы	141
Хинидин	135
Хинин	135
Хиноны	175
кроме нафтахинонов	164
Хлорокин	180
Хлорфенолы	252
Холестерин	160, 197
Холин	107
Цереброзиды	29
Цианамиды производные	239
Цианкобаламин	61
Циклогексиламины	112
Эритромицины	139
Эстрогены	131
Этилена производные ненасыщенные	130
Этинат	161
Эфиры азотной кислоты	99
жирных кислот	144
карбобензоксинаминокислот	60
лимонной кислоты	204
ацетилированные	204
простые ароматические	87
сахарозы	270
сложные	144
разделение на насыщенные и ненасыщенные	123
тиофосфорной кислоты	147, 191

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие к серии	8
Предисловие ко второму изданию	9
Предисловие к первому изданию	10
Предисловие автора ко второму изданию	11
Предисловие автора к первому изданию	13

Часть I

МЕТОДЫ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Глава I. Введение, история и общее описание	15
1. Введение	15
2. История тонкослойной хроматографии	17
3. Общее описание метода	21
4. Хроматографический процесс	23
Литература	25
Глава II. Продажные адсорбенты для тонкослойной хроматографии	28
1. Силикагель или кремневая кислота	28
2. Оксид алюминия	30
3. Диатомитовая земля	31
4. Силикат магния	31
5. Прочие неорганические адсорбенты	32
6. Целлюлоза и модифицированная целлюлоза	32
7. Ионообменные смолы	35
8. Прочие органические адсорбенты	35
9. Продажные готовые хроматографические пластинки	36
Литература	37
Глава III. Приготовление пластинок	38
1. Подложка	38
2. Адсорбент	43
3. Связующие материалы	55
4. Приготовление суспензий	58
5. Нанесение адсорбента на подложку	86
6. Сушка и активация слоя адсорбента	94
7. Специальная обработка адсорбентов	96
Литература	100
Глава IV. Нанесение пробы	111
1. Предварительная обработка	111
2. Методы нанесения пробы	112
Литература	119

Глава V. Получение хроматограмм	121
1. Выбор растворителя-элюента	121
2. Восходящее элюирование	129
3. Нисходящее элюирование	134
4. Горизонтальное элюирование	136
5. Специальные методы элюирования	139
Литература	187
Глава VI. Химические реакции на пластинках	194
1. Окисление	195
2. Восстановление	198
3. Дегидратация	201
4. Гидролиз	202
5. Галогенирование	203
6. Ферментативные реакции	205
7. Этерификация	205
8. Нитрование	207
9. Получение производных	207
10. Прочие реакции	210
Литература	212
Глава VII. Обнаружение бесцветных соединений	215
1. Универсальные реактивы (реактивы общего назначения)	216
2. Слой с флуоресцирующими добавками	220
3. Специфичные детектирующие реактивы	221
4. Радиоактивные методы	286
5. Биологические методы детектирования	286
Литература	289
Глава VIII. Документация результатов	299
1. Калькирование пятен или сохранение хроматографического слоя	299
2. Фотографирование и другие методы воспроизведения	300
3. Другие методы	302
Литература	303
Глава IX. Воспроизводимость значений R_f	305
Литература	311
Глава X. Препаративная хроматография	314
1. Применение колонок	314
2. Равномерные тонкие слои	318
3. Применение очень толстых слоев	323
Литература	325
Глава XI. Количественные методы	327
1. Экстракционные методы	330
2. Прямые количественные методы	339
3. Методы определения площади пятна	347
4. Предельная чувствительность	350
5. Биологическая проба	351
6. Радиоактивные методы	353
7. Различные методы	360
Литература	362

Глава XII. Комбинирование ТСХ с другими методами	372
1. Колоночная хроматография	372
2. Газовая хроматография	372
3. Спектрофотометрия	377
4. Смешанные комбинации	381
Литература	382

Часть II

ПРИМЕНЕНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Глава XIII. Кислоты	385
1. Алифатические монокарбоновые кислоты	385
2. Кетокислоты	390
3. Оксикислоты	391
4. Дикарбоновые кислоты	393
5. Кислоты ароматического ряда	396
6. Фенолокарбоновые кислоты	397
Литература	402
Глава XIV. Спирты и гликоли	405
1. Разделение спиртов	405
2. Разделение производных спиртов	410
3. Гликоли	414
Литература	419
Глава XV. Алкалоиды	422
1. Систематический анализ	422
2. Пуриновые алкалоиды	429
3. Фенилалкиламиновые алкалоиды	430
4. Пиридиновые алкалоиды	430
5. Пирролидиновые алкалоиды	431
6. Пиридин-пирролидиновые и дипиридиновые алкалоиды	431
7. Многоядерные пиперидин-пирролидиновые алкалоиды	432
8. Хинолиновые алкалоиды	434
9. Изохинолиновые алкалоиды	434
10. Индолы	438
11. Пирролизидиновые алкалоиды	446
12. Различные алкалоиды	447
Литература	448
Глава XVI. Амины	454
1. Алифатические амины	454
2. Ароматические амины	460
3. Азотсодержащие гетероциклические соединения	463
4. Различные азотсодержащие соединения	470
Литература	474
Глава XVII. Аминокислоты, белки и пептиды	478
1. Прямое разделение аминокислот	478
2. Разделение производных аминокислот	495
3. Разделение белков и пептидов	510
4. Количественный анализ	518
Литература	521

Глава XVIII. Антибиотики	528
1 Системы классификации	528
2 Метаболиты актиномицетов	533
3 Эритромицины	535
4 Неомицины	536
5. Пенициллины	537
6 Рифамицины	541
7 Тетрациклины	542
8 Пептидные антибиотики	544
9 Полиеновые макролидные антибиотики	544
10 Различные примеры применения	545
Литература	547
Глава XIX. Углеводы	550
1. Сахара	550
2 Производство сахаров	561
3 Декстрины	570
4. Количественные определения	571
5 Электрофорез углеводов	574
Литература	575
Глава XX. Карбонильные соединения	579
1. Непосредственное разделение	579
2 Разделение карбонильных производных	584
Литература	603
Реактивы для обнаружения отдельных соединений или соединений определенного типа	606

Ю. Кирхнер

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Том I

Научный редактор Р И Краснова Мл научный редактор И С Фрмичова
Художник Н Ф Алексеев Художественный редактор М Н Кузьмина
Технический редактор Е С Потапенкова Корректор Т П Пашковская

ИБ № 2323

Сдано в набор 06.06.80 Подписано в печать 10.11.80 Формат 60×90^{1/16} Бумага типограф-
ская № 2 Гарнитура литературная Печать высокая Объем 19,25 бум л Усл печ.
л 38,50 Уч изд л 42,91, Изд № 3/0810 Тираж 5000 экз. Зак. 255. Цена 5 р. 50 к.

Издательство «Мир»
129820, Москва, И 110, ГСП 1 й Рижский пер., 2

Ленинградская типография № 8 ордена Трудового Красного Знамени Ленинградского
объединения «Техническая книга» им Евгении Соколовой Союзполиграфпрома при
Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
190000 г Ленинград, Прачечный переулок, 6